

TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA

Doctorado en Ciencias de la Salud



Estudio de la estabilidad de los parámetros del hemograma y su relación con las alarmas generadas por los autoanalizadores hematológicos

<https://doi.org/10.48035/Tesis/2454/40312>

Autora - Irene Pérez Casas

Director de Tesis - Juan Manuel Casas Fernández de Tejerina

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar por su colaboración a Helena Redín, mi tutora de residencia de Análisis Clínicos, por ser mi mentora y la persona que me ha enseñado con paciencia el campo de la Hematología de laboratorio. Por su compromiso para hacer bien el trabajo, por su apoyo en todas las publicaciones que hemos hecho juntas, por escuchar cuando lo he necesitado; en definitiva, gracias por estar siempre dispuesta a ayudar.

Gracias también a mi director de tesis Juan Fernández de Casas Tejerina, por aceptar mi propuesta desde un principio y por apoyarme para la publicación de artículos como opción de mayor visibilidad para la elaboración de la tesis.

Quería agradecer la paciencia de mi marido Asier para leer mis trabajos; ha sido crítico, sincero y de gran ayuda en mis tres publicaciones. Pero, además, ha aportado ideas y puntos de vista nuevos desde una perspectiva distinta del laboratorio.

Si hay alguien a quien debería agradecer mi formación es a mis padres. Desde que decidí estudiar la rama sanitaria, mi madre me ha estimulado y ayudado para conseguir siempre lo mejor. Finalmente, gracias a mi hermano Fernando por el apoyo, comprensión y confianza que tenemos.

COMPENDIO DE PUBLICACIONES

Esta tesis doctoral titulada “Estudio de la estabilidad de los parámetros del hemograma y su relación con las alarmas generadas por los autoanalizadores hematológicos” ha sido realizada por la doctoranda Irene Pérez Casas y está basada en un compendio de tres artículos de investigación publicados en la revista *International Journal of Laboratory Hematology* y en la revista *Laboratory medicine*, clasificadas ambas dentro del Journal Citation Reports.

Los artículos de investigación incluidos en la tesis son los siguientes:

- Pérez, I., Redín, M. E., Vives, A., Garrido, A., Urrechaga, E. and Lacasta, M. (2016), *Local verification between the hematological analyzers Sysmex XN-series and XE-5000*. *International Journal of Laboratory Hematology*, 38: 256-264. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12478>.
- Pérez I, Redín ME. *Stability of leukocyte research parameters over time on the Sysmex XN: How to quantify the changes in cell morphology*. *Int J Lab Hem*. 2018; 00:1–8. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12866>.
- Pérez I, Redín ME. *Red blood cells and platelets conventional and research parameters: Stability remarks before their interpretation. A method to quantify and correct time-dependent changes*. *Laboratory Medicine*, 2020; 51: 460. <https://doi.org/10.1093/labmed/lmz083>.

Tanto la doctoranda como el director de esta tesis doctoral aseguramos que estos artículos incluidos no se han presentado previamente como parte de ninguna otra tesis doctoral.



Universidad Pública de Navarra
Nafarroako Unibertsitate Publikoa

Juan Manuel Casas Fernández de Tejerina, profesor Titular de Universidad en el área de Medicina, miembro del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Pública de Navarra, como director del trabajo de tesis doctoral,

Informa,

*Que el trabajo presentado por Dña Irene Pérez Casas, **“Estudio de la estabilidad de los parámetros del hemograma y su relación con las alarmas generadas por los autoanalizadores hematológicos”**, reúne a su criterio los requisitos científicos y formales suficientes para poder ser presentado como Tesis Doctoral con la finalidad de optar al título de Doctor ante el tribunal que proceda, y para que conste donde convenga, expide el presente certificado en Pamplona a 24 de Febrero de 2021.*

Juan Manuel Casas Fernández de Tejerina

INDICE

I. RESUMEN	11
II. PREÁMBULO.....	17
III. INTRODUCCIÓN	21
1. DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES HEMATOLÓGICAS y OTRAS PATOLOGÍAS REFLEJADAS EN EL HEMOGRAMA	21
2. ANALIZADORES HEMATOLÓGICOS	23
2.1 PRINCIPIO DE MEDIDA	24
3. PARÁMETROS DE INVESTIGACIÓN DEL HEMOGRAMA	26
3.1 UTILIDAD DIAGNÓSTICA DE LOS PARÁMETROS de INVESTIGACIÓN	27
3.1.1 Diagnóstico de patologías de origen infeccioso.....	27
3.1.2 Diagnóstico de enfermedades hematológicas.....	28
IV. ANTECEDENTES y JUSTIFICACIÓN	33
1. CENTRALIZACIÓN DE MUESTRAS EN GUIPÚZCOA	33
2. DESCENSO DE LA ESTABILIDAD DE LAS MUESTRAS	35
V. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	41
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	45
1. MUESTRA DE ESTUDIO	45
2. INSTRUMENTACIÓN	47
2.1 VOLUMEN DE MUESTRA Y REACTIVOS	47
2.2 TIPOS DE CANALES DE ANÁLISIS	48
2.3 PARÁMETROS DEL HEMOGRAMA	50
3. MÉTODOS	51
3.1 EVALUACIÓN DE MÉTODOS	52
3.1.1 Intercambiabilidad	52
3.1.2 Validez diagnóstica de alarmas	55
3.2 ESTUDIO DE ESTABILIDAD	61
3.2.1 Muestras	61
3.2.2 Metodología.....	61
3.2.3 Análisis Estadístico	62
VII. TRABAJOS PUBLICADOS.....	67
1. PRIMER ARTÍCULO	69
1.1 ARTÍCULO ORIGINAL	69
1.2 ANÁLISIS DEL ARTÍCULO EN CASTELLANO.....	79
1.2.1 Resultados	79
1.2.2 Discusión.....	81
1.2.3 Conclusiones	83

2. SEGUNDO ARTÍCULO.....	85
2.1 ARTÍCULO ORIGINAL	85
2.2 ANÁLISIS DEL ARTÍCULO EN CASTELLANO.....	93
2.2.1 Resultados	93
2.2.2 Discusión.....	93
2.2.3 Conclusiones	97
3. TERCER ARTÍCULO.....	99
3.1 ARTÍCULO ORIGINAL	99
3.2 ANÁLISIS DEL ARTÍCULO EN CASTELLANO.....	107
3.2.1 Resultados	107
3.2.2 Discusión.....	108
3.2.3 Conclusiones	112
IX. CONCLUSIONES	115
1. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS.....	115
1.1 PRIMER ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN.....	115
1.2 SEGUNDO ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN	115
1.3 TERCER ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN	116
2. CONCLUSIONES GENERALES.....	116
X. LIMITACIONES.....	121
1. PRIMER ARTÍCULO	121
2. SEGUNDO ARTÍCULO.....	122
3. TERCER ARTÍCULO.....	122
XI. PROYECCIONES.....	125
XII. IMPLICACIONES.....	129
XIII. REFERENCIAS.....	133

ABREVIATURAS

1. PARÁMETROS CONVENCIONALES

WBC: Recuento de leucocitos

BASO#: Recuento de basófilos absoluto

BASO%: Porcentaje de basófilos

NRBC#: Recuento de eritroblastos absoluto

NRBC%: Porcentaje de eritoblastos

NEUT#: Recuento de neutrófilos absoluto

NEUT%: Porcentaje de neutrófilos

LYMPH#: Recuento de linfocitos absoluto

LYMPH%: Porcentaje de linfocitos

MONO#: Recuento de monocitos

MONO%: Porcentaje de monocitos

EO#: Recuento de eosinófilos

EO%: Porcentaje de eosinófilos

IG#: Recuento de granulocitos inmaduros

IG%: Porcentaje de granulocitos inmaduros con respecto al recuento total de leucocitos

RET#: Recuento de reticulocitos

RET%: Porcentaje de reticulocitos

RBC: Recuento de Hematíes

HCT: Hematocrito

MCV: Volumen corpuscular medio

RDW-SD: Amplitud de distribución de los hematíes (desviación estándar)

RDW-CV: Amplitud de distribución de los hematíes (coeficiente de variación)

PDW: Amplitud de distribución de las plaquetas

MPV: Volumen medio plaquetario

PCT: Plaquetocrito

MCH: Hemoglobina corpuscular media

MCHC: Concentración de hemoglobina corpuscular media

HGB: Concentración de hemoglobina

2. PARÁMETROS CLÍNICOS AVANZADOS

RET-He: Equivalente de hemoglobina de los reticulocitos, refleja la hemoglobinización de la población de reticulocitos. Es útil en el diagnóstico y monitorización de la anemia ferropénica de una forma más temprana que el resto de parámetros clásicos pues refleja el aporte de hierro actual de la eritropoyesis.

IRF: Fracción de reticulocitos inmaduros. Sirve para medir la respuesta de la médula osea y se calcula por medio de los parámetros:

LFR: Porcentaje de reticulocitos de baja fluorescencia

MFR: Porcentaje de reticulocitos de fluorescencia media

HFR: Porcentaje de reticulocitos de alta fluorescencia

PLT-F: Recuento de plaquetas marcadas fluorescentes. Parámetro de alta precisión para el recuento de plaquetas en muestras trombocitopénicas.

IPF: Fracción de plaquetas inmaduras. Útil en el seguimiento de la trombocitopenia, refleja la actividad trombocitopoyética en la médula ósea.

P-LCR: Porcentaje de plaquetas grandes.

3. PARÁMETROS DE INVESTIGACIÓN

HFLC: Recuento de linfocitos de alta fluorescencia. Representa células activadas (células plasmáticas/linfocitos B productores de anticuerpos). Un recuento elevado es una indicación de una respuesta inmune a enfermedades infecciosas si previamente se descarta la presencia de enfermedades hematológicas sistémicas.

NE-SSC: Intensidad de dispersión lateral de la luz del área neutrófilos. El Side Scatter nos ofrece información sobre la complejidad celular como, por ejemplo, los orgánulos, vacuolas y otras inclusiones citoplásmicas. La hipergranulación tóxica es signo de una infección bacteriana, ayuda al diagnóstico de sepsis. Por el contrario, la hipogranulación junto con otros parámetros puede ser signo de un síndrome mielodisplásico.

NE-WX: Complejidad celular de neutrófilos y su amplitud de distribución. Es una medida de la heterogeneidad de los neutrófilos con respecto a NE-SSC.

NE-SFL: Intensidad de fluorescencia de la luz del área de los neutrófilos. La **fluorescencia** nos indica la cantidad de ADN y ARN presente en la célula, refleja la reactividad de los neutrófilos, representando su actividad metabólica que se encuentra aumentada en la infección bacteriana.

NE-WY: Intensidad de fluorescencia de neutrófilos y su amplitud de distribución. Es una medida de la heterogeneidad de los neutrófilos con respecto a NE-SFL.

NE-FSC: Intensidad de dispersión hacia adelante de la luz en el área de los neutrófilos. El Forward Scatter nos indica el volumen de la célula; el tamaño aumentado indica reactividad en neutrófilos.

NE-WZ: Tamaño de neutrófilos y su amplitud de distribución. Es una medida de la heterogeneidad de los neutrófilos con respecto a NE-FSC.

LY-X: Intensidad de dispersión lateral de la de la luz del área de linfocitos. Informa sobre la complejidad celular como, por ejemplo, los orgánulos presentes en los linfocitos granulares.

LY-WX: Complejidad de linfocitos y su amplitud de distribución. Es una medida de la heterogeneidad de los linfocitos con respecto a LY-X.

LY-Y: Intensidad de fluorescencia de la luz del área de los linfocitos. La **fluorescencia** nos indica la cantidad de ADN y ARN presente en la célula, refleja la reactividad de los linfocitos, representando la actividad metabólica característica de los linfocitos reactivos en infecciones virales o de los blastos en las leucemias.

LY-WY: Intensidad de fluorescencia de linfocitos y su amplitud de distribución. Es una medida de la heterogeneidad de los linfocitos con respecto a LY-Y.

LY-Z: Intensidad de dispersión hacia adelante de la luz en el área de los linfocitos. Indica el volumen de la célula; el tamaño es característico de los linfocitos reactivos en infecciones virales o de las células plasmáticas y blastos en leucemias.

LY-WZ: Tamaño de linfocitos y su amplitud de distribución. Es una medida de la heterogeneidad de los linfocitos con respecto a LY-Z.

MO-X: Intensidad de dispersión lateral de la de la luz del área de monocitos. Informa sobre la complejidad celular como orgánulos, vacuolas y otras inclusiones citoplásmicas.

MO-WX: Complejidad celular de monocitos y su amplitud de distribución. Es una medida de la heterogeneidad de los monocitos con respecto a MO-X.

MO-Y: Intensidad de fluorescencia de la luz del área de los monocitos. La **fluorescencia** nos indica la cantidad de ADN y ARN presente en la célula, representando su actividad metabólica (monocitos activados, monoblastos).

MO-WY: Intensidad de fluorescencia de monocitos y su amplitud de distribución. Es una medida de la heterogeneidad de los monocitos con respecto a MO-Y.

MO-Z: Intensidad de dispersión hacia adelante de la luz en el área de los monocitos. Indica el volumen de la célula.

MO-WZ: Tamaño de monocitos y su amplitud de distribución. Es una medida de la heterogeneidad de los monocitos con respecto a MO-WZ.

RBC-O: Recuento RBC calculado desde el canal RET.

MicroR: Porcentaje de hematíes microcíticos (micro RBC). Junto con otros parámetros sirve para distinguir la anemia debida a deficiencia de hierro de la talasemia.

MacroR: Porcentaje de hematíes macrocíticos (Macro RBC).

HYPO-He: Eritrocitos hipocrómicos. Junto con otros parámetros sirve para distinguir la anemia debida a la deficiencia de hierro de la talasemia.

HYPER-He: Eritrocitos hiperocrómicos.

RET-Y: Valor derivado del diagrama de dispersión de RET (reticulocitos) para determinar el valor de RET-He.

FRC: Eritrocitos fragmentados. Útil en la búsqueda de esquistocitos para el screening de microangiopatías.

RPI: Índice de producción de reticulocitos. Marcador de respuesta activa de la médula ósea ante la anemia.

RESUMEN

I. ABSTRACT

1. Local verification between the hematological analyzers Sysmex XN-series and XE-5000

Introduction: The aim of this study was to perform a verification of the hematology analyzer Sysmex XN-2000 by comparing with the previous XE-5000. This study assessed the precision and carryover on the XN-2000 and the systematic error between the both counters according to desirable biological variability criterion and a flag comparison study.

Methods: Within-run precision and between-batch precision were measured according to the ICSH guidelines. A comparative study was performed analyzing two hundred and sixty samples of peripheral blood from patients. The statistical study was conducted using the Passing-Bablok and Bland-Altman analyses. The leucocyte flag comparison was made by measuring the efficiency rate.

Results: Between-batch precision was lower than that recommended by the biological variability criterion and manufacturer specifications. The comparison gave nonagreement results for neutrophil and basophil counts according to the criterion of biological variability. Erythroblasts and immature granulocytes showed nonagreement, but there is no available biological variation database for these parameters to compare with. Nevertheless, excellent absolute agreement was found for red blood cell parameters, and for platelet, lymphocyte, monocyte, and eosinophil counts.

Conclusions: The global results obtained for the precision, comparability, and efficiency provide a satisfactory integration of the XN-2000 in the core laboratory routine and accomplish an optimal reliability.

2. Stability of leukocyte research parameters over time on the Sysmex XN: How to quantify the changes in cell morphology

Introduction: Research parameters of the Sysmex XN-series provide information about the cell morphology. The aim is to quantify time-dependent changes of conventional and research parameters and propose correction factors to be applied to the parameters, which revealed significant changes.

Methods: 284 EDTA blood samples were processed from 0 hours-12 hours and the mean percentage change ($\bar{X}_t\%$) of the leukocyte parameters was calculated. Stability was evaluated

according to three criteria: metrology criteria according to the between-batch analytical variation, metrology criteria according to within-run analytical variation, by which \bar{X}_t % could not exceed the Minimum Significant Change ($MSC = [\pm 1.65 * CV\%]$) and Biological criteria based on intraindividual biological variation, by which $\bar{X}_t\%$ could not exceed the Desirable Significant Change ($DSC = [\pm 0.5 * CVD\%]$). Mean deviation percentage of the parameters, which suffer significant changes was calculated and a multiplying factor was obtained to correct the signal deviation. Stability of abnormal leukocyte flags was also evaluated.

Results: Most of the cell count parameters are considered stable according to MSC and DSC. However, several research parameters of neutrophils and lymphocytes show alterations in stability after 4 hours, even when their respective cell count parameters are stable.

Conclusion: Morphological variations of neutrophils and lymphocytes can be quantified. This data can be used to correct the deviation in samples that cannot be analyzed before 4 hours.

3. Red Blood Cells and Platelets Conventional and Research Parameters: Stability Remarks Before Their Interpretation

Objectives: To analyze the stability of red blood cells, platelets, and reticulocytes of the research parameters, in combination with the respective conventional parameters, for each analyte; and to quantify the morphological changes in these analytes, to propose a correction factor for each.

Methods: Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) blood specimens from patients were reanalyzed in 2-hour intervals and then, the mean percentage ($\bar{X}_t\%$) changes were calculated. To evaluate the stability of the analyzed material, we used different criteria according to within-run and between-batch analytical variation, as well as intraindividual biological variation. Next, the mean deviation percentage of the parameters that undergo time-dependent significant changes was calculated, to obtain a correction factor.

Results: Several conventional and research parameters showed significant alterations in the stability at an early time after arrival at the laboratory.

Conclusion: Cell variations over time can be quantified and corrected by applying a multiplying factor to the signal obtained in the analyzer.

Keywords: stability; Sysmex XN; cell population data; cell population data parameters; preanalytical error; research parameters.

I. RESUMEN

1. Local verification between the hematological analyzers Sysmex XN-series and XE-5000

Introducción: El objetivo de este estudio fue realizar una verificación del analizador de hematología Sysmex XN-2000 comparándolo con el anterior XE-5000. Este estudio evaluó la precisión y el arrastre en el XN-2000, el error sistemático entre ambos analizadores según el criterio de variabilidad biológica deseable, así como un estudio comparativo de alarmas.

Métodos: La imprecisión intradía se midió de acuerdo con las directrices de ICSH. Se realizó un estudio comparativo analizando doscientas sesenta muestras de sangre periférica de pacientes. El estudio estadístico se realizó empleando los análisis de Passing-Bablok y Bland-Altman. La comparación de alarmas de leucocitos se realizó midiendo la tasa de eficiencia.

Resultados: La imprecisión intradía fue menor que la recomendada por el criterio de variabilidad biológica y las especificaciones del fabricante. La comparación mostró resultados no intercambiables para los recuentos de neutrófilos y basófilos según el criterio de variabilidad biológica. Los eritroblastos y los granulocitos inmaduros no mostraron intercambiabilidad, pero no hay una base de datos de variación biológica disponible para comparar estos parámetros. Sin embargo, se obtuvo una excelente intercambiabilidad absoluta para los parámetros de los hematíes y para los recuentos de plaquetas, linfocitos, monocitos y eosinófilos.

Conclusiones: Los resultados globales obtenidos para la precisión, intercambiabilidad y eficiencia muestran una integración satisfactoria del equipo XN-2000 en la rutina del laboratorio y logran una confiabilidad óptima.

2. Stability of leukocyte research parameters over time on the Sysmex XN: How to quantify the changes in cell morphology

Introducción: Los parámetros de investigación de la serie Sysmex XN proporcionan información sobre la morfología celular. El objetivo es cuantificar los cambios dependientes del tiempo en los parámetros convencionales y de investigación. Asimismo, se propone el cálculo de un factor de corrección en aquellos parámetros que sufren alteraciones significativas por pérdida de estabilidad.

Métodos: Se procesaron 284 muestras de sangre con EDTA de 0 horas a 12 horas y se calculó el cambio porcentual medio ($\bar{X}_t\%$) de los parámetros leucocitarios. La estabilidad se evaluó de

acuerdo con tres criterios: criterio metrológico de acuerdo con la variación analítica (CV) intradía, criterio metrológico de acuerdo con la variación analítica interdía, por la que $\bar{X}_t\%$ no debe exceder el cambio mínimo significativo ($MSC = [\pm 1,65 * CV\%]$) y Criterio biológico basado en la variación biológica intraindividual (CVD), según el cual $\bar{X}_t\%$ no debe exceder el Cambio Significativo Deseable ($DSC = [\pm 0.5 * CVD\%]$). Se calculó el porcentaje de desviación media de los parámetros que sufren cambios significativos y se obtuvo un factor multiplicador para corregir la desviación de la señal. También se evaluó la estabilidad de los indicadores de leucocitos anormales.

Resultados: La mayoría de los parámetros que expresan recuentos celulares se consideran estables según MSC y DSC. Sin embargo, varios parámetros de investigación de neutrófilos y linfocitos muestran alteraciones en la estabilidad después de 4 horas, incluso cuando sus respectivos parámetros de recuento celular son estables.

Conclusiones: Se pueden cuantificar las variaciones morfológicas de neutrófilos y linfocitos. Estos datos se pueden utilizar para corregir la desviación en muestras que no se pueden analizar antes de 4 horas.

3. Red Blood Cells and Platelets Conventional and Research Parameters: Stability Remarks Before Their Interpretation

Introducción: En este estudio se analiza la estabilidad de los parámetros convencionales y de investigación en hematíes, reticulocitos y plaquetas con el fin de cuantificar los cambios morfológicos que experimentan en función del tiempo. Finalmente se calcula un factor de corrección aplicable a todos aquellos parámetros que sufren alteraciones significativas en la estabilidad.

Métodos: Se volvieron a analizar muestras de sangre de pacientes con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en intervalos de 2 horas y, a continuación, se calcularon los cambios porcentuales medios ($\bar{X}_t\%$). Para evaluar la estabilidad del material analizado, utilizamos diferentes criterios de acuerdo con la variación analítica intradía e interdía, así como la variación biológica intraindividual. A continuación, se calculó el porcentaje de desviación media de los parámetros que sufren cambios significativos dependientes del tiempo, para obtener un factor de corrección.

Resultados: Varios parámetros convencionales y de investigación mostraron alteraciones significativas en la estabilidad en un momento temprano tras su llegada al laboratorio.

Conclusiones: Las variaciones que sufren las células a lo largo del tiempo se pueden cuantificar y corregir aplicando un factor multiplicador a la señal obtenida en el analizador.

Keywords: stability; Sysmex XN; cell population data; cell population data parameters; preanalytical error; research parameters.

PREÁMBULO

II. PREÁMBULO

Esta tesis es un compendio de tres trabajos realizados durante el periodo de doctorado y durante mi periodo de formación como especialista en Análisis Clínicos en el Laboratorio Hospital Universitario Donostia (LHUD).

Cuando se inició esta tesis, el analizador que se utilizaba en el LHUD era el modelo XE-5000 de la casa comercial Sysmex; se empleaban varios equipos dispuestos en fila consecutivamente con el fin de optimizar el procesamiento de muestras del hemograma. Sin embargo, la salida al mercado de los nuevos analizadores Sysmex XN-2000 suponía una mejora en la especificidad, mayor rapidez en el procesamiento de muestras y, por tanto, una mejora en el flujo de trabajo. Como consecuencia de este cambio de analizadores surge el **primer artículo de investigación** de esta tesis, que es un estudio de comparación de métodos de medida entre el analizador en uso (Sysmex XE-5000) y el que pretendía implantarse (Sysmex XN-2000).

Por otro lado, la unificación de laboratorios en Guipúzcoa, como objetivo principal del Plan Director de la Red de Diagnóstico Biológico, puso en marcha la centralización de análisis de muestras de rutina desde ambulatorios y hospitales comarcales al LHUD, que es el laboratorio de referencia en Guipúzcoa. Esto supuso un aumento de análisis de muestras en el LHUD, así como un retraso en su procesamiento. Había una percepción subjetiva que las muestras analizadas a finales de la jornada de trabajo presentaban mayor número de alarmas. De ahí surge el **segundo artículo de investigación** de esta tesis, que es un análisis de estabilidad de los parámetros del hemograma, concretamente de los leucocitos. Por medio de este estudio se analizan los parámetros convencionales y los parámetros de investigación, encontrándose entre ambos diferencias en la estabilidad dentro de algunos tipos de leucocitos. Además de este hallazgo, se propone una solución innovadora para contrarrestar la falta de estabilidad en algunos de los parámetros.

Debido al hallazgo encontrado en la serie leucocitaria, consideramos necesario hacer lo mismo con el resto de las series del hemograma. De ahí surge el **tercer artículo de investigación** de esta tesis, que sigue la misma metodología que el segundo artículo, pero

analizando los parámetros de la serie roja y plaquetar. De la misma forma, plantea una solución correctora cuyo fin es mejorar la estabilidad en algunos parámetros.

Estas publicaciones son consecuencia de una observación derivada de nuestra práctica clínica diaria en el laboratorio de hematimetría. La hipótesis inicial era una observación subjetiva del aumento del número de alarmas generadas por el analizador conforme aumentaba el tiempo entre la extracción sanguínea y su análisis. El objetivo consistía en demostrar dicha observación, pero descubrimos a lo largo de la evaluación de datos que el comportamiento no era igual en todos los tipos de parámetros.

Las muestras empleadas en este estudio son sangre total EDTA de pacientes que se analizan de manera rutinaria tras petición médica. A excepción de algunos criterios mínimos de calidad, como son la inspección visual para evitar interferencias de tipo endógenas (lipemia, hemólisis e ictericia), las muestras fueron seleccionadas de manera aleatoria tratando de cubrir todo el rango analítico de medición del parámetro en cuestión.

INTRODUCCIÓN

III. INTRODUCCIÓN

Esta tesis doctoral es un trabajo que se desarrolla en la práctica clínica de la medicina del laboratorio. Durante la elaboración de esta tesis se han publicado tres artículos de investigación que son resumen de los resultados del tema de tesis. Dentro de la medicina del laboratorio, su utilidad se concreta en la ciencia de la Hematología, así como en la Calidad del laboratorio clínico.

A continuación, se exponen el marco teórico y conceptual de la tesis incluyendo la justificación de su elaboración.

1. DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES HEMATOLÓGICAS Y OTRAS PATOLOGÍAS REFLEJADAS EN EL HEMOGRAMA

El diagnóstico de las enfermedades hematológicas se inicia con una sospecha debido a la sintomatología del paciente o por un hallazgo casual en el hemograma.

El hemograma se obtiene tras procesar una muestra de sangre total anticoagulada con EDTA dipotásico (K2EDTA) por un autoanalizador. Es una prueba rutinaria realizada en el laboratorio clínico que refleja la hematopoyesis de médula ósea. Es una herramienta de diagnóstico y monitorización de enfermedades que se compone del recuento de tres tipos de células sanguíneas: hematíes, leucocitos y plaquetas. Estas células se producen y maduran principalmente en la médula ósea, y son liberadas a sangre periférica según las necesidades del organismo.

Los autoanalizadores hematológicos integran en un mismo equipo diferentes técnicas instrumentales para analizar de manera simultánea el recuento de todas las células, así como otros parámetros que informan sobre las características celulares. Un hemograma estándar incluye las siguientes pruebas:

- Evaluación de la serie roja:

Los hematíes se producen en la médula ósea y se liberan en forma de reticulocitos para terminar su maduración en sangre. Contienen una proteína llamada hemoglobina, cuya función es transportar oxígeno por todo el organismo. Su forma y tamaño es muy parecido en todos los individuos. Sin embargo, el tamaño y color varía en el déficit de vitamina B12, folato, hierro y en una gran variedad de patologías (1). Cuando la concentración de hemoglobina es inferior a un valor determinado según sexo y edad, se dice que existe anemia. Atendiendo al número de hematíes, cuando su valor está por encima del valor de referencia puede ser de causa fisiológica (vivir en zonas de altitud) o patológica (cardiopatías, EPOC y policitemia vera, entre otras).

Los parámetros convencionales de serie roja son: recuento de hematíes, hemoglobina (Hb), hematocrito e índice eritrocitarios como volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (MHC), concentración corpuscular media de hemoglobina (MCHC), amplitud de distribución de hematíes (RDW) y recuento de reticulocitos.

- Evaluación de la serie blanca:

Los leucocitos se generan en médula ósea y son las células principales del sistema inmunitario del organismo, siendo su función más importante la de proteger frente a las infecciones (2). El número y porcentaje de leucocitos se ven alterados por una gran variedad de situaciones tanto fisiológicas (embarazo, realizar deporte) como patológicas (infecciones, patología cardíaca, parasitosis, leucemias etc.).

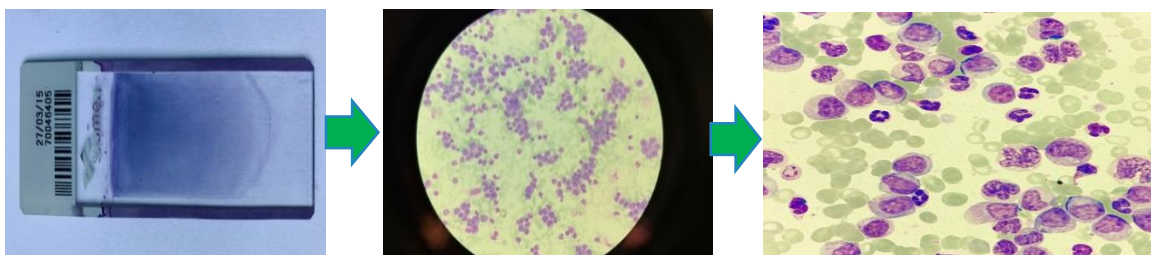
Los parámetros convencionales de leucocitos son: recuento leucocitario y fórmula diferencial. El recuento leucocitario es el conteo total de leucocitos en sangre, y la fórmula diferencial es el recuento de cada uno de los tipos de leucocitos: Granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos), linfocitos y monocitos. Además, también cuenta los estadios inmaduros de los granulocitos, es decir, los granulocitos inmaduros. Por lo general, los leucocitos están presentes en la sangre en porcentajes relativamente estables.

- Evaluación de la serie plaquetar:

Las plaquetas son unos fragmentos celulares provenientes del megacariocito que desempeñan un importante papel en la coagulación y hemostasia de la sangre (3). El déficit de plaquetas supone un mayor riesgo de sufrir hemorragias, pero su exceso puede favorecer la formación de trombos en vasos sanguíneos, dificultando el riego de diferentes territorios del organismo. Su número puede aumentar o disminuir en procesos reactivos a otras patologías, o por alguna alteración en médula ósea.

Parámetros: recuento de plaquetas, volumen plaquetar medio (VPM) y amplitud de distribución plaquetar (PDW).

Tras la evaluación del hemograma pueden observarse anomalías en alguna o varias líneas celulares que pueden ser consecuencia de distintas patologías, para lo cual deberá de solicitarse otras pruebas adicionales como es la morfología celular. La morfología celular se analiza mediante la observación al microscopio de una extensión de sangre, también llamada frotis sanguíneo. El especialista en Análisis Clínicos y el especialista en Hematología miran la extensión teñida al microscopio para valorar el tamaño, color, forma, aspecto, orgánulos de citoplasma y núcleo de las células. Finalmente se hace una valoración conjunta entre el hemograma y el frotis sanguíneo para ser informados al médico solicitante.



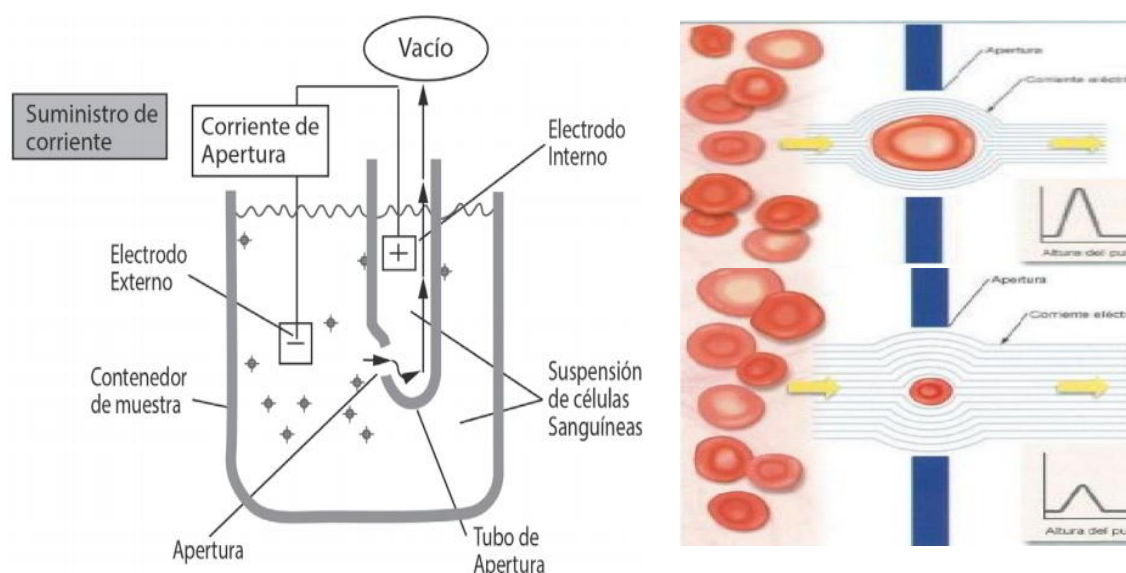
2. ANALIZADORES HEMATOLÓGICOS

Son sistemas automatizados que mediante distintos métodos instrumentales cuentan las células principales de la sangre periférica. La hemoglobina se cuantifica mediante

espectrofotometría, los hematíes mediante el método de impedancia eléctrica y los leucocitos por citometría de flujo. A continuación, nos centraremos en los dos últimos.

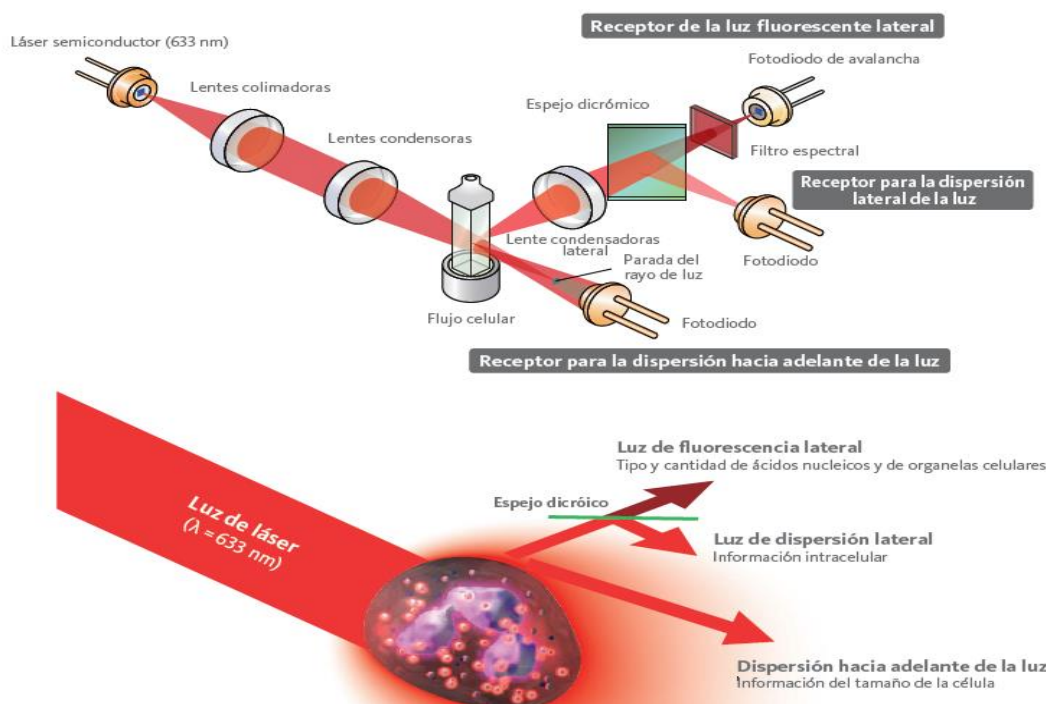
2.1 PRINCIPIO DE MEDIDA

La **impedancia eléctrica**, también conocida como principio de Coulter, se basa en la resistencia que presentan las células a conducir la corriente eléctrica al pasar por un orificio que separa dos medios con diferente potencial. El número de interrupciones se detecta como bajadas de voltaje, que es proporcional al número de hematíes que pasa por el orificio. La intensidad de voltaje es proporcional al tamaño del hematíe, es decir, al volumen corpuscular medio.



Impedancia eléctrica para recuento de hematíes.

El análisis celular leucocitario se realizó basándose en el principio de la **citometría de flujo** utilizando un láser semiconductor ($\lambda = 633 \text{ nm}$), el cual interactúa con cada célula de la sangre emitiendo una señal. El analizador emplea tres tipos de señales para clasificar las células: a) luz fluorescente lateral (SFL), b) luz dispersa hacia adelante (FSC) y c) luz dispersa lateral (SSC). La intensidad de la luz fluorescente lateral refleja el tipo y la cantidad de ácidos nucleicos y orgánulos celulares. La intensidad del FSC refleja el tamaño y volumen de la célula, mientras que la intensidad del SSC refleja la complejidad intracelular. Por lo tanto, las células más grandes y las estructuras intracelulares más complejas muestran intensidades de señales FSC y SSC mayores (4).



Principio de medición por citometría de flujo con láser semiconductor. XN-Series Clinical Case Report Vol. First edition, First print: August 2011.

Una vez identificados y cuantificados los distintos tipos celulares, se produce una concentración de las células en diferentes grupos según su volumen o su capacidad de dispersión de las radiaciones para ser clasificadas en grupos con similares características. Pues bien, la representación gráfica de estas agrupaciones celulares recibe el nombre de escatograma o diagrama de dispersión.

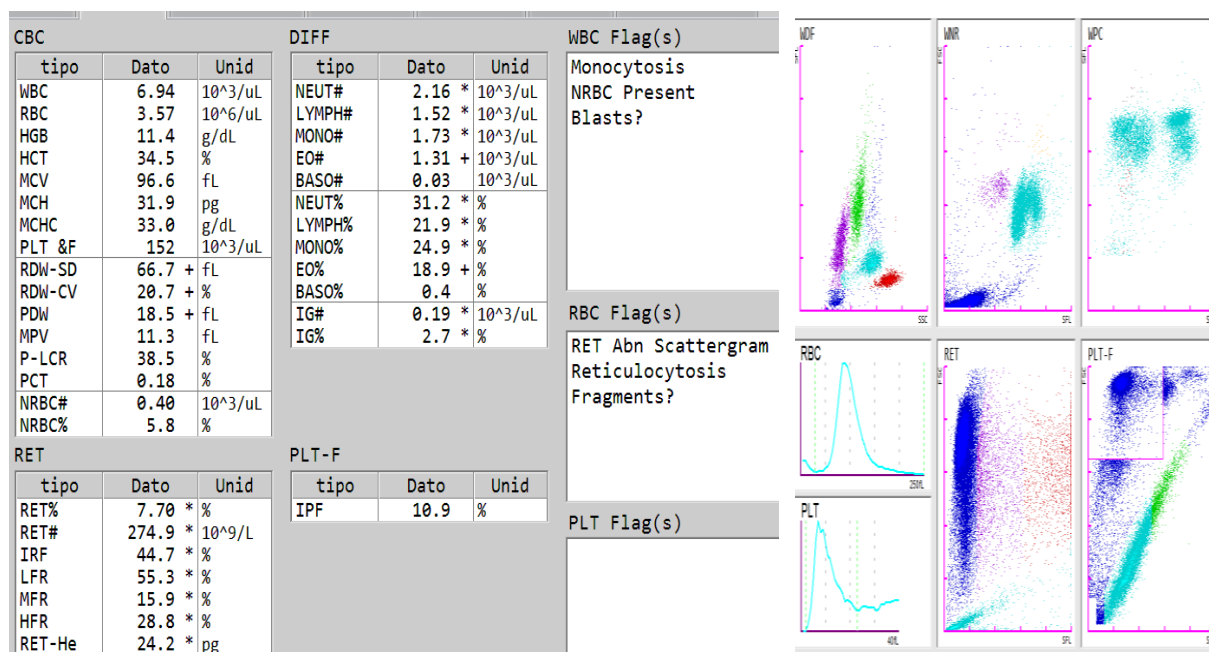


Imagen de un hemograma en el analizador Sysmex. A la derecha se representan los escatogramas.

3. PARÁMETROS DE INVESTIGACIÓN DEL HEMOGRAMA

Algunos analizadores además de analizar los parámetros convencionales del hemograma realizan un estudio más detallado de las células a través de los **parámetros de investigación (PI)**. Cada casa comercial emplea sus propios parámetros de investigación, es decir, pueden ser parámetros distintos según el modelo del analizador. Inicialmente, estos parámetros sólo eran utilizados como herramienta para configurar y monitorizar correctamente la clasificación de las distintas poblaciones celulares por el servicio técnico de la empresa fabricante del autoanalizador (5). Sin embargo, desde el 2005 se están publicando cada vez más estudios que muestran aplicaciones potenciales de estos parámetros y su relación con distintas patologías.

Por el momento los PI no se utilizan con fines diagnósticos, excepto en algunos casos, pero sí pueden ofrecer información útil durante la evaluación del hemograma. De hecho, son una herramienta complementaria de diagnóstico interesante al utilizarse combinados con los parámetros convencionales. No obstante, los resultados de la mayoría de estos parámetros no se informan directamente al médico peticionario, sólo se utilizan internamente en el laboratorio para verificar los resultados y concluir los hallazgos diagnósticos (6).

Los PI brindan información sobre la morfología celular y el grado de inmadurez celular, siendo a menudo utilizados por el médico hematólogo para predecir la recuperación de la médula ósea tras un tratamiento quimioterápico (7). Publicaciones recientes han demostrado tener las siguientes utilidades:

- Diagnóstico precoz de sepsis (8).
- Exclusión de leucemia promielocítica aguda (9).
- Detección de infección viral (10).
- Monitorización del trasplante de células madre (11).
- Detección del síndrome mielodisplásico (12).
- Detección de hemoglobinuria paroxística nocturna (13).
- Distinción de linfocitosis reactiva versus clonal (14).
- Detección de la infección por malaria (15).

3.1 UTILIDAD DIAGNÓSTICA DE LOS PARÁMETROS DE INVESTIGACIÓN

3.1.1 Diagnóstico de patologías de origen infeccioso

PI de neutrófilos en la infección bacteriana aguda:

En la infección bacteriana aguda se liberan rápidamente granulocitos desde la médula ósea, aumentando en mayor porcentaje la producción de neutrófilos. Además de la neutrofilia, se observa una mayor liberación de formas inmaduras o desviación izquierda, como, por ejemplo: cayados, metamielocitos, mielocitos y promielocitos. También se producen una serie de cambios morfológicos en los neutrófilos que reflejan la reactividad de su estado, como la presencia de hipergranulación tóxica, vacuolización, cuerpos de Döhle y aumento de tamaño. La población de neutrófilos se vuelve más heterogénea, con una mayor variabilidad de tamaños y formas celulares. Estos cambios morfológicos pueden medirse cuantitativamente mediante los parámetros de investigación NE-SSC, NE-FSC y NE-SFL (16).

PI de linfocitos en la infección viral

La presencia de virus produce la activación de linfocitos; los linfocitos activados, también denominados linfocitos reactivos, se diferencian de los que están en reposo por cambios morfológicos como el aumento de tamaño y alteraciones en la composición citoplasmática. Estos cambios morfológicos pueden detectarse utilizándose los parámetros de investigación **LY-X**, **LY-Y**, **LY-Z** y **HFLC** (17). Un ejemplo interesante de la utilidad de estos parámetros es en la detección de linfocitos reactivos en la mononucleosis infecciosa. En la mayoría de los casos este síndrome es debido al virus de Epstein-Barr, para lo que será necesario añadir un estudio de serología. Una vez desestimada su presencia habría que

descartar otros agentes causales como el Citomegalovirus, hepatitis, Toxoplasma e VIH, entre otros.

PI de monocitos en la infección

Así como los linfocitos y neutrófilos, los monocitos también sufren cambios en el tamaño durante la infección bacteriana y vírica. El parámetro MO-X informa de la complejidad intracelular, que se ve significativamente aumentada en pacientes con sepsis (18).

3.1.2 Diagnóstico de enfermedades hematológicas

La hipogranulación en los neutrófilos puede ser signo de una enfermedad hematológica. El Síndrome Mielodisplásico es un conjunto de alteraciones morfológicas, inmunofenotípicas, funcionales y genómicas que afectan a la línea mieloide. Se produce una mielopoyesis ineficaz que origina una o varias citopenias en sangre periférica (19). Si la línea afectada es la granulocítica, una de las alteraciones morfológicas que puede observarse en el frotis es la hipogranulación en los neutrófilos. Este descenso en la granulación puede medirse cuantitativamente mediante el parámetro **NE-SSC** (20) y, junto con valores de otros parámetros del hemograma, generar alarmas para la revisión del frotis, hallando de manera más temprana la enfermedad.

Los **linfocitos de alta fluorescencia (HFLC)** se clasifican en el escategrama mediante los parámetros **LY-X**, **LY-Y** y **LY-Z**, es decir, según su complejidad intracelular, contenido en DNA/RNA y tamaño respectivamente (21). Se corresponden con linfocitos B activados sintetizadores de anticuerpos o células plasmáticas. Estas células no están en sangre periférica a menos que exista una infección o una enfermedad hematológica. Las enfermedades hematológicas que habría que descartar son: mieloma múltiple, plasmocitoma y macroglobulinemia de Waldeström.

La presencia de linfocitosis con linfocitos de pequeño tamaño de baja relación núcleo citoplasma, núcleo de aspecto maduro en grumelé y abundantes sombras de grumpecht es característico de la leucemia linfática crónica (LLC). La combinación de los parámetros LY-Z con LY-Y se utiliza en el algoritmo interno del analizador para detectar linfocitos anormales.

La presencia de linfocitosis con linfocitos de abundante citoplasma y granulación azurófila puede ser signo de leucemia. La Leucemia de linfocitos grandes granulares (LLG) en la mayoría de pacientes presenta un curso evolutivo crónico e indolente, y en algunos casos puede remitir espontáneamente. Según de qué estirpe celular se trate se distinguen dos entidades: LLG de origen T (LLG-T) y LLG de células NK (LLG-NK) (22). La combinación de los parámetros LY-X, LY-Y y LY-Z puede ayudar a diferenciar la presencia de LLG de otras leucemias de origen linfoide (17).

Hay otros parámetros que se utilizan para conocer en qué situación u actividad se encuentra la médula ósea tras recibir un tratamiento quimioterápico. Los parámetros de investigación que reflejan la eritropoyesis de manera más temprana son la **Fracción de Reticulocitos Inmaduros (IRF)** y el **Índice de Producción de Reticulocitos (RPI)** (23). En cuanto a la serie plaquetar, el parámetro que refleja la trombopoyesis de manera más eficaz es la **Fracción de Plaquetas Inmaduras (IPF)** (24). Los tres parámetros son utilizados por el especialista hematólogo en la monitorización del trasplante de médula ósea como marcadores de recuperación y regeneración medular (25).

En las patologías que cursan con destrucción celular también encontramos parámetros con utilidad clínica. Por ejemplo, el porcentaje de **Fragmentos Hemáticos (FRC)** es de utilidad como herramienta de apoyo para el diagnóstico de la anemia hemolítica, la púrpura trombótica trombocitopénica, así como de la microangiopatía trombótica. A los hematíes fragmentados se les denomina esquistocitos y pueden presentar formas muy variadas (26). Entre otras causas, su aparición puede ser debida a Púrpura trombótica trombocitopénica (PTT), glomerulonefritis y a daños mecánicos, como, por ejemplo, al entrar en contacto

con zonas de endotelio alterado patológicamente o a la existencia de un torrente circulatorio de origen turbulento o de válvulas cardíacas anormales. Estas alteraciones pueden romper los hematíes y generar restos celulares con forma de casco y otras formas (27).

En la elucidación del origen de algunos tipos de anemias, recientes publicaciones han demostrado la utilidad de los PI de serie roja. Por ejemplo, en un screening inicial, para saber si la anemia es debida a un déficit de hierro se pueden utilizar los parámetros **MicroRBC** e **Hipo-He**. En la anemia ferropénica encontraremos aumentados ambos parámetros, aunque será necesaria la confirmación mediante otras pruebas bioquímicas. Estos dos parámetros combinados también son útiles para el screening de la talasemia, en el que encontraremos solamente aumentado **MicroRBC**. Otra posibilidad es combinar los parámetros **MicroRBC** e **Hiper-He** con el fin de diagnosticar una posible Esferocitosis Hereditaria, ya que, en esta enfermedad los hematíes son de tamaño pequeño e hiperocrómicos (28).

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

IV. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

1. CENTRALIZACIÓN DE MUESTRAS EN GUIPÚZCOA

En septiembre de 2010, el Servicio Vasco de Salud-Osakidetza puso en marcha el Plan Director de la Red de Diagnóstico Biológico. Se trata de un proyecto que engloba a todos los servicios de diagnóstico biológico de Osakidetza, como son Análisis Clínicos y Bioquímica Clínica, Microbiología y Parasitología, Hematología, Hemoterapia, Inmunología, Genética y Anatomía Patológica. Es un modelo de laboratorios en red porque cada laboratorio tiene su identidad propia, pero funciona de manera interdependiente con el resto de laboratorios (29).

Está caracterizado por ciertos elementos corporativos que toda la red comparte en sus distintos niveles. Los elementos corporativos son: modelo de gestión, sistemas de información, cartera de servicios, gestión de la demanda, gestión de compras y gestión de las personas. El objetivo final del Plan Director es mejorar la gestión de los recursos humanos, económicos y tecnológicos.

La red consta de tres niveles de trabajo; el nivel superior es el órgano coordinador y director, el segundo nivel es representado por las unidades de gestión clínica y el nivel inferior lo constituye el conjunto de centros o nodos que componen la red. Las Unidades de Gestión Clínica (UGC) son las siguientes:

- **UGC GIPUZKOA:** Hospital Donostia, Hospital Bidasoa, Hospital Mendaró, Hospital Zumarraga.
- **UGC ÁLAVA:** HUA (Sedes Txagorritxu y Santiago), Hospital Alto Deba Hospital Leza.
- **UGC BASURTO:** Hospital Basurto, Hospital Sta. Marina.
- **UGC CRUCES:** Hospital Cruces, Hospital S. Eloy, Hospital Urduliz.
- **UGC GALDAKAO:** Hospital Galdakao, Hospital Gernika.

Dentro de cada UGC hay un laboratorio central, también llamado laboratorio de referencia, al que se envían las muestras de análisis de rutina o análisis de pruebas más específicas y complejas; el resto son Laboratorios de respuesta hospitalaria (LRH) y Urgencias (LURG). Las LRH están ubicadas en hospitales comarcales que dan servicio, fundamentalmente, a los pacientes ingresados y a las solicitudes urgentes en un contexto de integración con el laboratorio central de la UGC (30).

En el caso concreto de la UGC Gipuzkoa, el **Hospital Universitario Donostia** es el hospital de referencia para toda Guipúzcoa. Uno de los servicios centrales que lo integran es el **Laboratorio Hospital Universitario Donostia (LHUD)**, que, además de procesar sus propias muestras de pacientes ingresados y de urgencias, analiza diariamente las muestras de rutina de todos los ambulatorios y hospitales comarcales de la provincia de Guipúzcoa.



Para poder analizar diariamente las muestras de otros centros existe un sistema organizado de envío y recepción de muestras desde los hospitales comarcales y ambulatorios al LHUD. Sin embargo, debido a la complejidad en el diseño de las rutas de transporte y de la orografía de Guipúzcoa, la hora aproximada de llegada de las muestras desde varios de estos centros al LHUD es posterior a las 12 p.m,

habiendo sido extraídas del paciente de 8 a 9 am. Una media de 1400 muestras al día no se procesa antes de las 12 p.m, lo cual implica un retraso de ≥ 4 horas post-extracción. Este retraso se percibe en las muestras anticoaguladas con EDTA que, a pesar de estar contenidas en tubos de anticoagulación, muestran alteraciones morfológicas en el frotis de sangre.

2. DESCENSO DE LA ESTABILIDAD DE LAS MUESTRAS

El mayor número de errores de laboratorio se produce durante la fase pre-analítica (31). Uno de los factores que mayor incertidumbre añade a la fase pre-analítica es el tiempo transcurrido desde la venopunción hasta el análisis de la muestra. Este período de tiempo ha sido analizado y definido junto con condiciones de temperatura por el International Council for Standardization in Haematology (ICSH) para diferentes parámetros del hemograma (32). Sin embargo, debido a la gran variabilidad de resultados, en muchos casos dependientes del analizador (33), es importante conocer los requerimientos de estabilidad de acuerdo a su aplicación diagnóstica (34). Así por ejemplo, encontraremos requisitos diferentes de estabilidad para la realización de estudios prospectivos epidemiológicos en biobancos (35,36), en estudios de antidopping (37-39), de conservación de hemoderivados para transfusión, o de diagnóstico clínico de enfermedades hematológicas.

El tiempo trascurrido desde la venopunción hasta el análisis de la muestra superior a 2 horas es una circunstancia frecuente en la práctica clínica del laboratorio, especialmente cuando las muestras de sangre no se procesan en el mismo lugar de extracción y deben ser enviadas a otros laboratorios centrales. Sin embargo, para el diagnóstico de los desórdenes hematológicos es de vital importancia preservar tanto los parámetros cuantitativos como las características morfológicas celulares del paciente con el fin de llegar a un diagnóstico preciso.

El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) es el anticoagulante de elección para el estudio de células en sangre periférica. Las células anticoaguladas con EDTA permanecen vivas durante un breve tiempo post-extracción, por lo que son metabólicamente activas y siguen sufriendo cambios *in vitro*; de modo que, cuanto mayor es el tiempo de retraso en el análisis, más alteraciones morfológicas postpunción se apreciarán (40). A veces estos cambios son inherentes al paciente, en cambio, otras son propias de las condiciones *in vitro* de la muestra, por lo que puede ser difícil diferenciar el origen de la alteración morfológica en cuestión.

Por otro lado, mediante el desarrollo y automatización de los laboratorios clínicos se ha conseguido un procesamiento de análisis de muestras de gran eficiencia. Concretamente, en el campo de la hematimetría, el empleo de autoanalizadores hematológicos de cuarta generación permite obtener un hemograma junto a una serie de alarmas que sugieren un estudio más profundo de la muestra por medio del frotis. El objetivo de estas alarmas es mejorar la sensibilidad y especificidad del hemograma.

Gracias a las alarmas del hemograma se ha conseguido disminuir el número de frotis necesario para revisar al microscopio con el fin de confirmar la ausencia de enfermedad hematológica. Están configuradas en el software del autoanalyzer y aparecen tras el análisis de una muestra de sangre cuando cumplen los criterios de revisión del frotis. Estos criterios se establecen en base al valor de ciertos parámetros y pueden ser tanto morfológicos como cuantitativos.

Las alarmas que surgen como consecuencia de un criterio morfológico son configuradas inicialmente por la empresa fabricante y responden a la presencia de células anormales, las cuales no deberían de estar presente en la sangre de un paciente sano (41). Este tipo de células suelen alterar uno o varios parámetros de investigación. Por el momento, no hay muchos estudios sobre la estabilidad de los parámetros de investigación, a pesar de que pueden dar información cuantificable de la estabilidad de las células incluso antes que las de sus respectivos parámetros convencionales. No obstante, lo que sí sospechamos es que alterar las condiciones de estabilidad de las células puede generar en el momento del análisis una

clasificación o interpretación errónea cuando los parámetros de investigación han sido utilizados como una herramienta de apoyo a los parámetros convencionales.

Un exceso de falsas alarmas disminuye la eficiencia del flujo de trabajo, pues para confirmar la presencia de células anormales ha de realizarse un frotis de sangre y ser comprobado al microscopio. Este proceso no es inmediato y supone un consumo extra de tiempo, de recursos materiales y de personal.

Del mismo modo que algunos parámetros del hemograma sufren alteraciones debidas al retraso en el análisis, las células del frotis sanguíneo también muestran alteraciones que se perciben al microscopio. Los cambios morfológicos debidos a la falta de estabilidad a veces pueden confundirse con alteraciones morfológicas secundarias a una patología, por lo que es necesario una valoración experta para discernir la patología de la falta de estabilidad.

En resumen, el retraso en el análisis de las muestras puede afectar al ritmo de trabajo de la cadena de hematología y suponer un exceso de valoraciones expertas innecesarias.

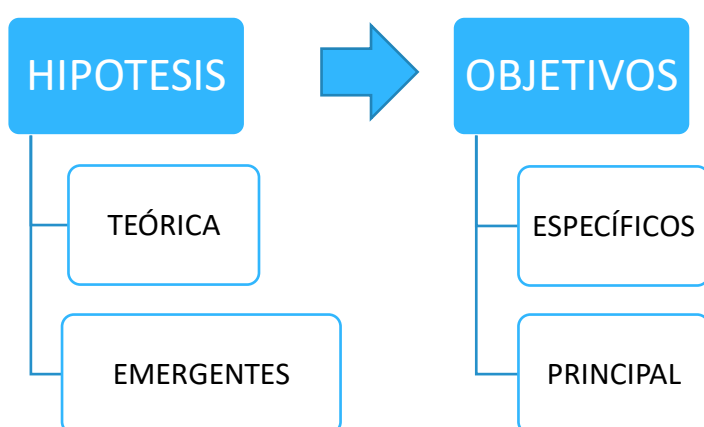
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

V. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Uno de los retos que surgen durante la elaboración de esta tesis ha sido confirmar la presencia de cambios significativos en la estabilidad de las células a través de los parámetros del hemograma. Para ello, no sólo se han analizado los parámetros convencionales del hemograma, sino también los parámetros de investigación que expresan madurez y morfología celular. Estas características de la célula son descritas mediante el frotis de sangre de manera cualitativa, pero, exceptuando algún parámetro como el volumen corpuscular medio, no hay otra manera de cuantificar las características morfológicas de la célula.

El objetivo es transformar una información de tipo cualitativa con posible sesgo de interpretación como es el frotis de sangre, en el que la subjetividad del observador supone una variabilidad en la obtención de resultados, en una información de tipo cuantitativa necesaria para extraer conclusiones.

Mediante los parámetros de investigación se puede cuantificar la magnitud de los cambios debidos al aumento del tiempo transcurrido desde la venopunción hasta el análisis de la muestra. Una vez medida la magnitud del cambio puede calcularse un factor de corrección para aquellos parámetros que sufran cambios significativos debidos a la pérdida de estabilidad.



HIPÓTESIS

Hipótesis teórica

Son las hipótesis iniciales con las que empieza el estudio:

- Los parámetros del hemograma se ven alterados significativamente en el sistema de gestión de muestras de tipo centralizado actual→pérdida de calidad.
- Las muestras de sangre total EDTA que sufren retraso en su análisis presentan mayor número de alarmas del hemograma→pérdida de especificidad.

Hipótesis emergentes

Son hipótesis que surgen durante la obtención y observación de resultados.

- Los cambios morfológicos que experimentan las células debidas al retraso en el análisis pueden cuantificarse siguiendo criterios de calidad del laboratorio.
- Pueden corregirse los cambios significativos mediante un factor de corrección.

OBJETIVOS

Objetivos específicos

- Verificar que el analizador XE-5000 con el que surge la hipótesis teórica es intercambiable al nuevo analizador XN-2000 con el cual se desarrolla la tesis.
- Evaluar la estabilidad de los parámetros convencionales y de investigación del hemograma en las tres series celulares (leucocitos, hematíes y plaquetas).
- Evaluar la estabilidad de las alarmas de la serie leucocitaria del hemograma.

Objetivo principal

- Analizar la estabilidad de las muestras de sangre-EDTA para el estudio del hemograma en las condiciones habituales de trabajo del laboratorio. Con ello se pretende evaluar la estrategia de procesamiento de muestras instaurado en el Laboratorio de Hematimetría del Hospital Universitario Donostia.

MATERIAL Y MÉTODOS

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MUESTRA DE ESTUDIO

En el análisis de estabilidad del segundo y tercer artículo la muestra inicial de estudio es la misma (n=300 muestras de sangre total-EDTA de pacientes ingresados y de Urgencias). A continuación, se expone la distribución de las muestras:

1.1 Primer artículo

a) Imprecisión

- Interserial: control de calidad de ROCHE diagnostics XN-CHECK niveles de concentración high, normal y low level.
- Intradía: 10 muestras de sangre total-EDTA de pacientes
 - Hematológicos con leucemia (n=3): leucocitos >30.000/uL, hemoglobina=7 g/dL o plaquetas<50.000/uL.
 - Oncológicos (n=2): plaquetas <30.000 ó >10⁶ /uL.
 - Procedentes de Urgencias (n=3): Hemoglobina <7 g/dL.
 - Sanos (n=2): parámetros dentro de valores de referencia.

b) Arrastre

Se emplearon un total de 10 muestras de sangre total-EDTA de pacientes

- Pacientes con hemoglobina 19 g/dL y 7 g/dL
- Pacientes con leucocitos 50.000/uL y 1000/uL
- Pacientes con plaquetas 1.100.000/uL y 1.000/uL
- Pacientes con 3% y 0% de reticulocitos
- Pacientes con 7% y 0% de eritroblastos

c) Correlación y sesgo

Se emplearon 260 muestras de sangre total-EDTA de pacientes de:

- Urgencias (n=38)
- Cuidados Intensivos (n=14)
- Hematología (n=76)
- Oncología (n=14)
- Rutina-ambulatoria (n=118)

1.2 Segundo artículo

a) Imprecisión

- Interserial:
Es la misma muestra que el primer artículo.
- Intraindividual:
Obtenido de la base de datos para la especificación de la variabilidad biológica deseable (42).
- Intradía:
Es la misma muestra que el primer artículo.

b) Estabilidad:

Finalmente, se evaluaron un total de 284 muestras de sangre total-EDTA tras eliminar 16 muestras por errores durante el análisis y tras realizar el test de Q Dixon.

1.3 Tercer artículo

a) Imprecisión

- Interserial:
Es la misma muestra que el primer artículo.
- Intraindividual:
Obtenido de la base de datos para la especificación de la variabilidad biológica deseable (42).
- Intradía:
Es la misma muestra que el primer artículo.

b) Estabilidad:

Finalmente se evaluaron un total de 264 muestras de sangre total-EDTA tras eliminar 36 muestras por errores durante el análisis y tras realizar el test de Q Dixon.

2. INSTRUMENTACIÓN

Para el análisis de muestras se emplearon los analizadores Symex XE-5000 y XN-2000 (Symex Corporation-Kobe Japan). Para procesar la muestra lo único que es necesario es introducirlo en un rack transportador; la punción del tubo, extracción de la muestra de sangre, añadido de reactivos, mezcla y detección de los analitos lo hace el analizador de manera automática. El láser empleado es de tipo I (IEC60825-1:2007).

2.1 VOLUMEN DE MUESTRA Y REACTIVOS

El volumen de muestra de sangre-EDTA que utiliza el analizador es de 88 μ L.

Los reactivos empleados son los siguientes:

Nombre de marca	Volumen	Temperatura de almacenamiento	Temperatura de uso	Vida útil después de abierto	Composición
CELLPACK DCL	20 L	2 - 35°C	15 - 30°C	60 días	Cloruro sódico 0,7% Tampón tris 0,2% EDTA-2K 0,02%
	10 L				
CELLPACK DST	20 L			60 días	Cloruro sódico 15,7% Tampón tris 4,3% EDTA-2K 0,4%
	10 L				
	4 L				
CELLPACK DFL	1,5 L			60 días	Tampón tricina 0,17%
SULFOLYSER	1,5 L	1 - 30°C		60 días	Sodium lauryl sulfate 1,8 g/L
Lysercell WNR	4 L	2 - 35°C		60 días	Sales orgánicas cuaternarias de amonio 0,20% Agente tensioactivo no iónico 0,10%
Lysercell WDF	4 L			90 días	Sales orgánicas cuaternarias de amonio 0,07% Agente tensioactivo no iónico 0,17%
Lysercell WPC	1,5 L			90 días	Agente tensioactivo aniónico 0,03% Agente tensioactivo no iónico 0,12%
Fluorocell WNR	82 mL			90 días	Tinte de polimetina 0,005% Etilenglicol 99,9%
Fluorocell WDF	42 mL			90 días	Tinte de polimetina 0,002% Metanol 3,0% Etilenglicol 96,9%
Fluorocell RET	12 mL			90 días	Tinte de polimetina 0,03% Metanol 7,9% Etilenglicol 92,0%
Fluorocell PLT	12 mL			90 días	Tinte de oxazina 0,003% Etilenglicol 99,9%
Fluorocell WPC	12 mL			90 días	Tinte de polimetina 0,004% Etanol 15,1% Etilenglicol 84,8%
CELLCLEAN	50 mL	1 - 30°C		-	Hipoclorito sódico (concentración disponible en cloro 5,0%)

2.2 TIPOS DE CANALES DE ANÁLISIS

Canal WDF

Este canal cuenta los leucocitos totales y realiza un recuento diferencial de neutrófilos, linfocitos, monocitos y eosinófilos. Además, detecta la presencia de linfocitos atípicos, linfocitos anormales y blastos. En primer lugar, actúa un surfactante que lisa los hematíes y plaquetas, para que a continuación el Lysercell WDF penetre en la membrana celular de leucocitos causando cambios en la forma externa y la estructura interna. Estos cambios dependen de las características celulares de cada leucocito. Un fluorocromo (Fluorocell WDF) se une a los ácidos nucleicos y orgánulos celulares de los leucocitos. La intensidad de la fluorescencia varía según el tipo y la cantidad de ácidos nucleicos y orgánulos celulares. Las diferencias de fluorescencia y luz dispersa en los leucocitos permiten separar y trazar cada tipo de célula en un diagrama de dispersión para cuantificar cada población celular por separado (43).

Canal WNR.

Este canal cuenta los leucocitos totales y realiza un recuento diferencial de basófilos y eritroblastos. El proceso de hemólisis, la penetración del reactivo en las células, la unión al fluorocromo es similar al canal WDF, pero la composición del reactivo es diferente. Las diferencias en la intensidad de las señales de fluorescencia, FSC Y SSC de los basófilos y eritroblastos permiten separarlos del resto de leucocitos.

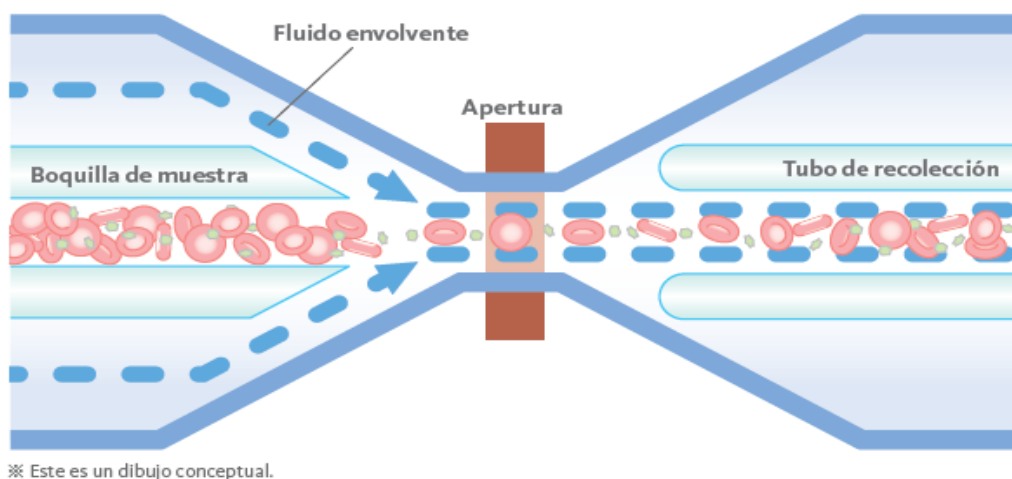
Canal de WPC.

Este canal cuenta leucocitos totales, detecta blastos y células anormales de la serie de linfocitos. La hemólisis, penetración del reactivo en las células y el proceso de unión al fluorocromo son similares a los de los canales WDF y WNR, pero el fluorocromo reacciona especialmente con los blastos y linfocitos anormales porque tienen diferencias en la membrana (lípidos, expresión de moléculas superficiales, etc.) y la composición intracelular en contraste con las células normales.

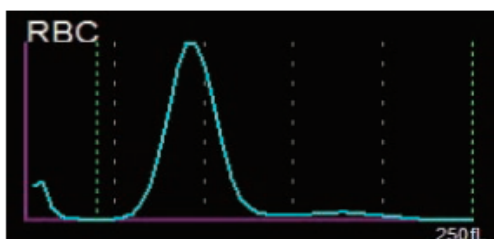
Canal RBC / PLT

Este canal se basa en el principio Coulter para clasificar las células, contando los hematíes y las plaquetas mediante el método de detección del canal de flujo de corriente continua.

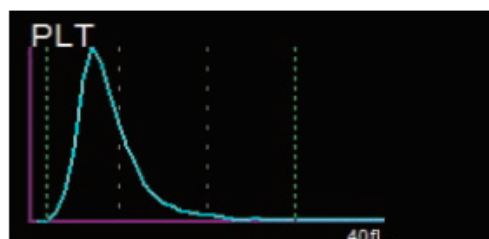
Para ello, diluye la muestra y hace pasar de una en una las células a través de una apertura, en cuyos extremos se sitúan unos electrodos que transmiten una corriente de manera continua. Cada célula que pasa detiene el paso de corriente, es decir, se genera un pulso de corriente proporcional al tamaño de la célula. Estas señales eléctricas son transformadas en curvas de distribución de volumen o histogramas (44).



Histograma RBC



Histograma PLT



Principio de medida de detección del canal de flujo de corriente continua. XN-Series
Clinical Case Report Vol. First edition, First print: August 2011.

Canal RET

Un fluorocromo marca los ácidos nucleicos de reticulocitos y leucocitos, pero no de los hematíes pues no poseen DNA ni RNA. La señal recibida tras la interacción del fluorocromo con el láser permite diferenciar mediante el FSC el tamaño característico de los reticulocitos, que, a su vez, son subclasificados según su señal de fluorescencia SFL. De este modo, los reticulocitos se clasifican en baja, media y alta fluorescencia, siendo los más inmaduros los que mayor señal de fluorescencia tienen (23).

Canal PLT

El fluorocromo se une específicamente a las plaquetas y tras la interacción con el láser se obtiene una señal FSC que corresponde al tamaño pequeño de las plaquetas. Mediante la señal SFL se separan las plaquetas en función de su grado de fluorescencia. Las plaquetas de mayor fluorescencia y tamaño corresponden a la fracción de plaquetas inmaduras (24).

2.3 PARÁMETROS DEL HEMOGRAMA

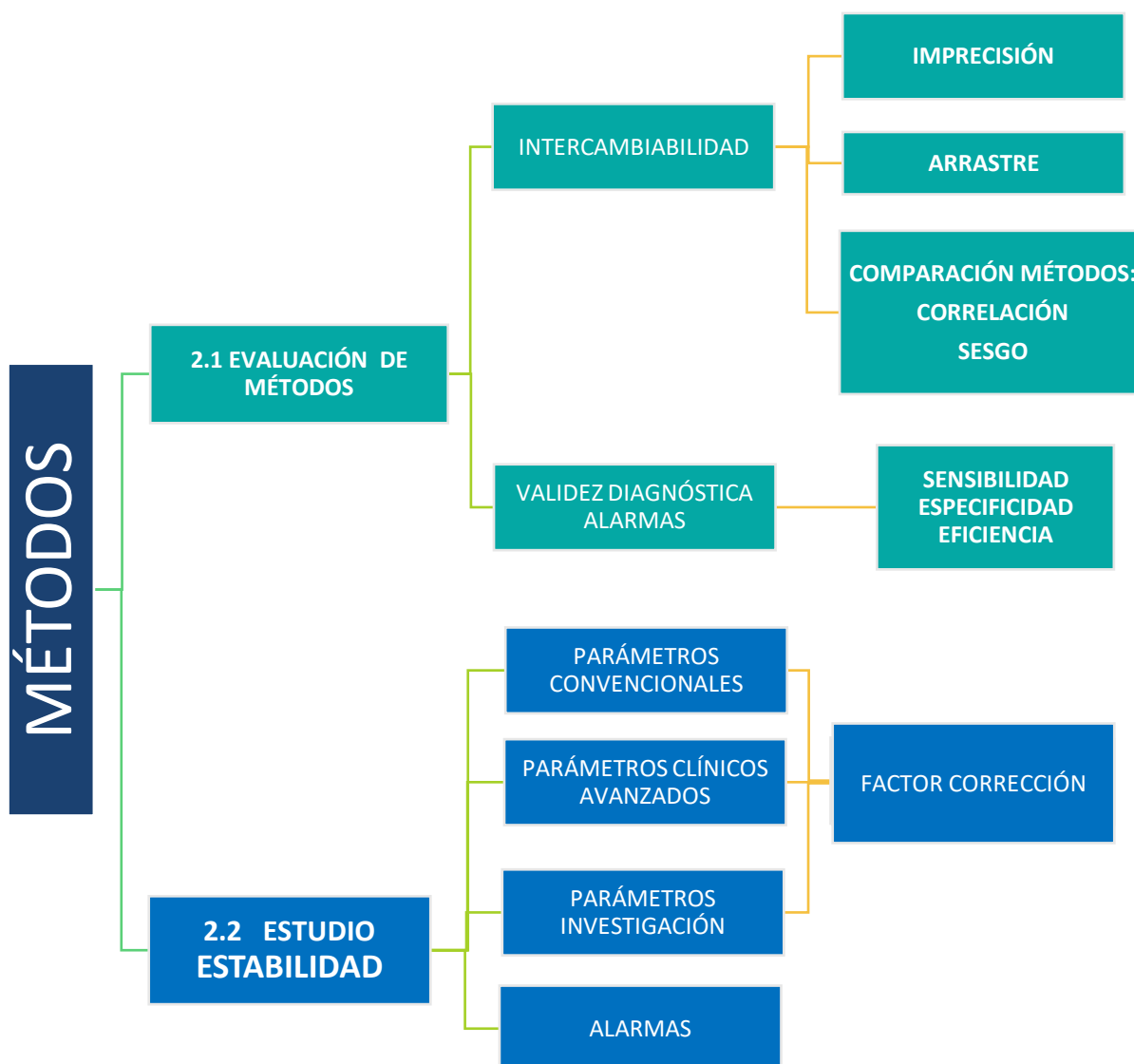
El significado de cada uno de ellos se encuentra en la sección de abreviaturas. Atendiendo a las guías del fabricante, los parámetros del hemograma se clasifican en tres grupos:

- Parámetros convencionales: todos aquellos parámetros clásicos del hemograma que proporcionan de manera individualizada información relevante para el diagnóstico, y que están destinados a ser compartidos con el médico petionario (45).
- Parámetros clínicos avanzados: conjunto de parámetros ampliados en una selección de analizadores. Ofrecen un valor añadido que supera al análisis hematológico tradicional y suponen la base para generar evidencia clínica (46).
- Parámetros de investigación: proporcionan información relevante para el diagnóstico, pero, por el momento, sólo se utilizan en el laboratorio de manera interna con fines relacionados con la validación de resultados analíticos. Por lo tanto, no están destinados a ser compartidos directamente con el médico petionario (47).

3. MÉTODOS

Esta tesis doctoral está compuesta de dos estudios. El **primer estudio** es una Comparación de Métodos realizada en base al analizador hematológico en uso (XE-5000) y el nuevo analizador que pretende implantarse (XN-2000) en el área de Hematimetría. Como se ha dicho anteriormente, la hipótesis inicial de la tesis surge cuando estaba implantado el analizador XE-5000. El **segundo estudio** es una evaluación de la estabilidad con el analizador XN-2000.

A continuación, se expone el esquema de trabajo del primer y segundo estudio de la tesis:



3.1 EVALUACIÓN DE MÉTODOS

Previamente a la implantación del nuevo analizador hematológico XN-2000 se realiza un estudio de verificación en el que ha de analizarse la intercambiabilidad entre el analizador hematológico en uso XE-5000 y el que pretende implantarse XN-2000.

Este procedimiento es necesario para poder realizar el estudio y entender cómo trabaja el analizador con el que se realizará el proceso de investigación de la tesis doctoral, que es, además, una de las funciones del Analista Clínico adquiridas durante el proceso de formación de la residencia.

El estudio de comparación de métodos comprende a su vez de:

3.1.1 Intercambiabilidad

Para realizar este estudio se han seguido las directrices del International Council for Standardization in Haematology (*ICSH*) (48). Se han analizado un total de 260 muestras de pacientes por ambos analizadores. Los datos han sido recogidos, trasladados y analizados en Excel Microsoft.

Se han analizado la **imprecisión**, el **arrastre**, la **correlación** y **sesgo** entre los auto-analizadores Sysmex XE-5000 y Sysmex XN-2000 empleando materiales de referencia para la imprecisión y muestras de sangre periférica de pacientes adultos anticoaguladas con K2EDTA (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA), que llegan al laboratorio hospitalario de este estudio.

a) Imprecisión

Se evaluaron la imprecisión interserial e intradía siguiendo las directrices del *ICSH* (48).

Para la **imprecisión interserial** se ha empleado como material de referencia control de calidad de ROCHE diagnostics XN-CHECK (Sysmex Europe GmbH,

Norderstedt, Germany) con tres niveles de concentración (high, normal y low level). Durante 30 días se analizaron los tres niveles de concentración por duplicado, se realizó un estudio de datos aberrantes y se calculó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV%) de cada parámetro para cada nivel de material de control.

Para la **imprecisión intradía** se seleccionaron 10 muestras de sangre periférica: tres pertenecían a pacientes hematológicos (con leucemia y valores alterados de leucocitos y plaquetas), dos a pacientes oncológicos (con valores de plaquetas alterados), tres a pacientes que presentaban anemia ($Hgb < 7$ g/dL) y dos a pacientes cuyos parámetros de estudio estaban dentro de valores de referencia. A cada uno de estos pacientes se midió, por separado, diez veces consecutivas los siguientes parámetros: leucocitos (WBC), hematíes (RBC), hemoglobina (HGB), volumen corpuscular medio (VCM), hematocrito (HCT), Hemoglobina corpuscular media (MCH), Concentración de hemoglobina corpuscular media (MHCM), plaquetas (PLT), eritroblastos (NRBC), reticulocitos (RET) y recuento diferencial leucocitario (DIFF). Se calculó la media, desviación estándar y el coeficiente de variación (CV%) de los parámetros de estudio de cada tipo de paciente. La imprecisión se expresa como el coeficiente de variación (CV).

b) Arrastre

Para evaluar el arrastre se emplearon muestras de sangre de pacientes con elevada y baja concentración en alguno de los parámetros de estudio (WBC, HGB, PLT, NRBC% y RET%). Para ello se analizó tres veces consecutivas una muestra muy concentrada (A1, A2, A3) seguida de una muestra con baja concentración (B1, B2, B3) en el parámetro de estudio, también tres veces consecutivas (5).

El porcentaje de arrastre se calcula con la siguiente fórmula:

$$[(B1-B3) / (A3-B3)] * 100$$

c) Comparación de métodos: correlación y sesgo

Se analizaron por ambos equipos, en un intervalo de tiempo inferior a 2 horas y a lo largo de un mes, 260 muestras recientes de pacientes. Para ello, se escogió una muestra poblacional variada procedente de las áreas de Urgencias (n=38), Cuidados Intensivos (n=14), Hematología (n=76), Oncología (n=14) y Rutina-ambulatoria (n=118). Los valores aberrantes fueron eliminados siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Española de Química Clínica (SECQ) (49). Para conocer el tipo de distribución en que se agrupan los datos, se ha realizado un contraste de normalidad en cada parámetro de estudio. Se calculó el coeficiente de correlación de Spearman (rho) para comprobar inicialmente la existencia de correlación. A continuación, se ha realizado un estudio de Regresión de Passing Bablock complementándose con el Análisis de diferencias de Bland Altman, considerando la existencia de error sistemático cuando éste es significativo por ambos estudios (50). Ante la existencia de una diferencia significativa proporcional, puede estimarse el error sistemático del procedimiento de medida como el valor de la media de las diferencias (RDM%) (51). Finalmente, se ha comparado el error sistemático en cada uno de los parámetros con la especificación del error sistemático de la variabilidad biológica ($SE_{DEV}\%$) obtenido del estudio publicado por ricos et al. (42). Se considera un sesgo a tener en cuenta cuando el valor de la media de las diferencias es superior a la especificación del error sistemático de la variabilidad biológica ($RDM\% > SE_{DEV}\%$).

El programa estadístico empleado para el análisis de regresión de Passing Bablock y el estudio de diferencias de Bland Altman ha sido MedCalc® v10.2.0.

3.1.2 Validez diagnóstica de alarmas

Se analizaron por ambos equipos 126 muestras de pacientes seleccionadas por presentar alarmas de tipo cualitativo en el analizador de uso XE-5000. A continuación, se realizó un frotis por el extensor Sysmex SP1000® (tiempo <2 horas) para ser verificado al microscopio, que se considerará en este estudio como el criterio de referencia.

Los parámetros calculados para el análisis de la validez diagnóstica de las 126 extensiones que fueron seleccionadas al azar por presentar alguna de las alarmas de serie blanca mencionadas han sido: sensibilidad, especificidad y eficiencia (52).

$$\text{Eficiencia} = \frac{VP + VN}{VP + VN + FP + FN}$$

[VP: Verdadero Positivo; VN: Verdadero Negativo; FP: Falso Positivo; FN: Falso Negativo]

Para el estudio estadístico de las diferencias se ha empleado el test de Mc Nemar mediante el programa MedCalc® v10.2.0. Para cada tipo de alarma se ha evaluado si existen diferencias significativas en la eficiencia ($p < 0.05$).

Cada laboratorio establece sus reglas de revisión de alarmas dependiendo de la población de estudio, la relevancia clínica de la alarma, del volumen de muestras, de la confiabilidad del sistema de alarmas y del nivel de formación del personal técnico.

En el laboratorio donde se realiza este estudio, las alarmas de tipo cualitativo de la serie blanca generadas por XE/XN Sysmex se evalúan de forma conjunta con el hemograma y el frotis, emitiendo un informe que responde a la conformidad o no de la alarma generada por el autoanalizador.

Las alarmas que se analizaron fueron: **Blastos, Linfocitos anormales, Linfocitos atípicos y Granulocitos inmaduros.**

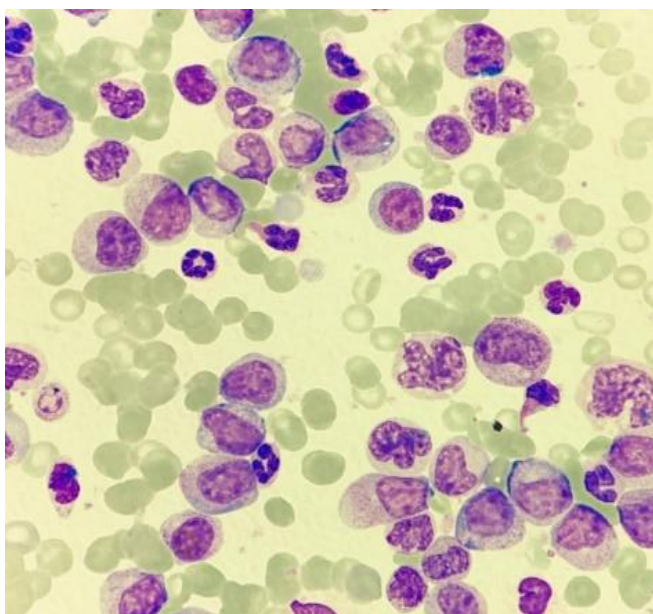
▪ BLASTOS

Los blastos son células inmaduras que se encuentran en médula ósea, por lo que su presencia en sangre periférica es considerada un signo de alarma.

La alarma generada en el XE-5000 se codifica como “Blast” si ha detectado su presencia desde un principio o como “Abnormal Linfo/LinfoBlast” en caso de no ser capaz de diferenciar ante la presencia de blastos o linfocitos anormales. Para su detección es necesario combinar la información de los canales DIFF e IMI para poder diferenciar si la estirpe es de origen linfoide Vs mieloide.

En un análisis inicial, el XN-2000 entrega la misma alarma combinada “Abnormal Linfo/LinfoBlast” que el XE-5000; sin embargo, a través del modo réflex, realiza un segundo análisis automático utilizando el canal WPC (en

lugar del IMI). Tras este reanálisis entregará un resultado definitivo, es decir, es capaz de discernir entre “Blastos” y “Linfocitos anormales”, o, incluso, de anular la alarma en caso de no detectar la presencia de ninguno. Para la mayoría de hemopatías, la alarma de blastos coincide con la presencia de blastos de



Blastos en la Leucemia Mielocítica Crónica.

origen mieloide o linfoide. Sin embargo, la alarma de linfocitos anormales es capaz de diferenciar el origen linfoide de los blastos.

El fundamento de su detección se basa en que la célula blástica inmadura tiene una membrana lipídica menos gruesa o estable frente al reactivo Lysercell, de modo que el fluorocromo es capaz de penetrar más fácilmente y unirse a los ácidos nucleicos dando una señal fluorescente diferente al de una célula madura (53).

WBC	218.53	10 ⁹ /L	+
RBC	3.72	10 ¹² /L	
HGB	103	g/L	
HCT	0.343	L/L	
MCV	92.2	fL	
MCH	27.7	pg	
MCHC	300	g/L	-
PLT	1031	10 ⁹ /L	+
RDW-SD	56.9	fL	+
RDW-CV	17.0	%	+
PDW	12.5	fL	
MPV	10.6	fL	
P-LCR	30.0	%	
PCT	0.011	L/L	+
NRBC	1.52	10 ⁹ /L	0.7/100 WBC

NEUT	184.46	10 ⁹ /L	*	84.4	%	*
LYMPH	5.97	10 ⁹ /L	*	2.7	%	*
MONO	6.52	10 ⁹ /L	*	3.0	%	*
EO	7.78	10 ⁹ /L	*	3.6	%	*
BASO	13.80	10 ⁹ /L	+	6.3	%	+
IG	72.11	10 ⁹ /L	*	33.0	%	*
RET	100.1	10 ⁹ /L		2.69	%	
IRF	30.8	%				
LFR	69.2	%				
MFR	18.4	%				
HFR	12.4	%				
RET-He	26.3	pg				
IPF	50.3	10 ⁹ /L		4.8	%	

Alarma(s) en leucocitos (WBC)

Alteración en el escatograma de leucocitos (WBC)

Neutrofilia

Linfocitosis

Monocitosis

Eosinofilia

Basofilia

Leucocitosis

Presencia de granulocitos inmaduros (IG)

Blastos?

Desviación izquierda?

Alarma(s) en hematias (RBC)

Alarma(s) en plaquetas (PLT)

Trombocitosis

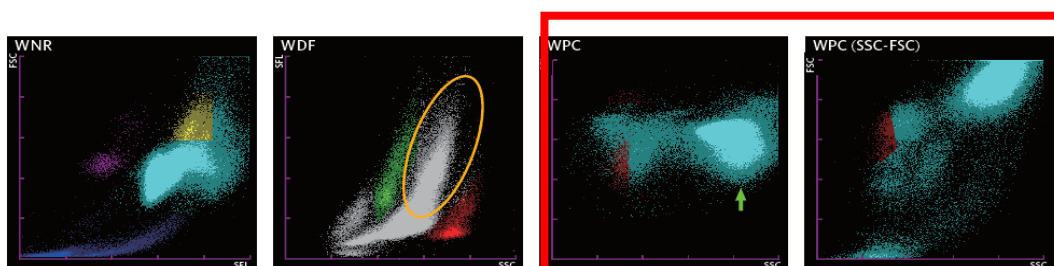


Imagen que representa la presencia de blastos en el escatograma WPC por medio de puntos rojos. XN-Series Clinical Case Report Vol. First edition, First print: August 2011.

▪ LINFOCITOS ANORMALES

Existe cierta controversia en cuanto a su clasificación; según el grupo de European LeukemiaNet classification, no es el término adecuado para informar de su presencia (54). En lugar de linfocitos anormales se prefiere el término de “Linfocitos atípicos-sospecha neoplásica”; sin embargo, Sysmex sigue expresando su presencia con la alarma “Abnormal Lympho?”.

Los autoanalizadores Sysmex detectan su presencia cuando se trata de linfocitos de origen maligno o clonal, pero, como se ha mencionado

anteriormente, cuando el XE-5000 detecta su presencia genera la alarma combinada “Abnormal Linfo/LinfoBlast”. Sin embargo, el XN-2000 a través del modo réflex es capaz de desdoblar esta misma alarma combinada entregando directamente el resultado de su presencia mediante la alarma “Abnormal Lympho?”.

WBC	195.86 $10^9/L$	+	NEUT	2.51 $10^9/L$	*	1.2 %	*
RBC	3.42 $10^{12}/L$		LYMPH	190.42 $10^9/L$	*	97.2 %	*
HGB	109 g/L		MONO	1.34 $10^9/L$	*	0.7 %	*
HCT	0.374 L/L		EO	0.11 $10^9/L$		0.1 %	
MCV	109.4 fL		BASO	1.48 $10^9/L$	+	0.8 %	
MCH	31.9 pg		IG	0.16 $10^9/L$	*	0.1 %	*
MCHC	291 g/L	-	RET	24.6 $10^9/L$		0.72 %	
PLT	131 $10^9/L$		IRF	11.8 %			
RDW-SD	57.4 fL	+	LFR	88.2 %			
RDW-CV	14.5 %		MFR	10.4 %			
PDW	11.5 fL		HFR	1.4 %			
MPV	10.3 fL		RET-He	33.4 pg			
P-LCR	26.8 %		IPF	3.5 $10^9/L$		2.7 %	
PCT	0.0013 L/L	-					
NRBC	0.00 $10^9/L$						
		0.0/100 WBC					

Alarma(s) en leucocitos (WBC)

Alteración en el escatograma de leucocitos (WBC)

Linfocitosis

Monocitosis

Basofilia

Leucocitosis

Presencia de granulocitos inmaduros (IG)

Linfocitos anormales?

Alarma(s) en hematíes (RBC)

Alarma(s) en plaquetas (PLT)

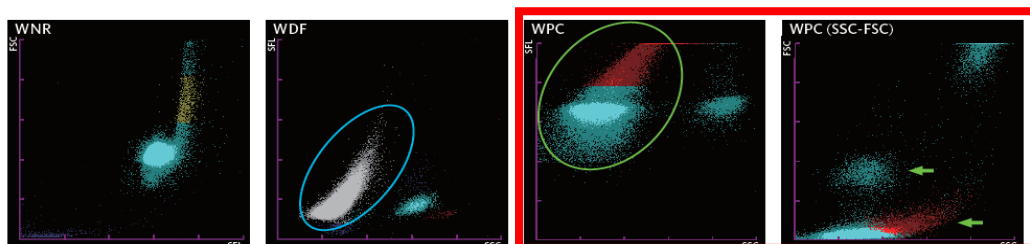
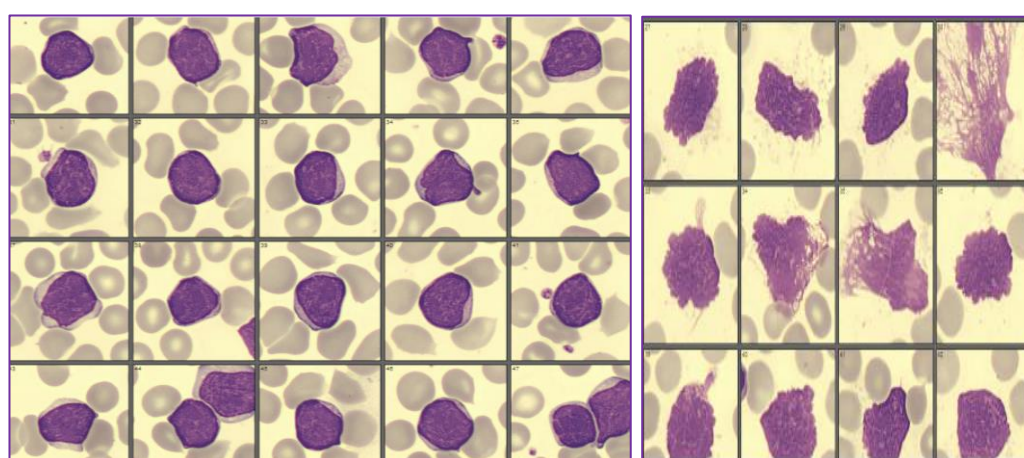


Imagen que representa la presencia de linfocitos anormales en el escatograma WPC por medio de puntos rojos. XN-Series Clinical Case Report Vol. First edition, First print: August 2011.



Linfocitos anormales en la Leucemia Linfocítica Crónica junto a abundantes sombras de Grümpecht (cuadro derecha).

▪ LINFOCITOS ATÍPICOS

Se agrupan en el diagrama de dispersión en la zona de mayor fluorescencia del diagrama DIFF, que surge como una prolongación de puntos contiguos a la agrupación de linfocitos. Tanto XE como XN informan de su presencia bajo el nombre de la alarma “Atipical Limpho?”. Se considera a todos aquellos linfocitos de etiología benigna que se producen de manera reactiva a la presencia de un agente causal. El término más adecuado para informar de su presencia es el de “Linfocitos atípicos-sospecha reactiva o Linfocitos reactivos” (55). Son linfocitos que presentan cierta desviación de la morfología normal, con aumento de tamaño, de membrana irregular, con/sin eritroadherencia, citoplasma basófilo de intensidad variable, posible presencia de nucléolo y falta de condensación cromatínica.

WBC	13.95 $10^9/L$	NEUT	2.27 $10^9/L$ *	16.4 % *
RBC	5.36 $10^{12}/L$	LYMPH	10.34 $10^9/L$ *	74.1 % *
HGB	159 g/L	MONO	1.08 $10^9/L$ *	7.7 % *
HCT	0.489 L/L	EO	0.02 $10^9/L$	0.1 %
MCV	91.2 fL	BASO	0.24 $10^9/L$ +	1.7 % +
MCH	29.7 pg	IG	0.03 $10^9/L$ *	0.2 % *
MCHC	325 g/L	RET	76.6 $10^9/L$	1.43 %
PLT	200 $10^9/L$	IRF	16.7 %	
RDW-SD	42.0 fL	LFR	83.3 %	
RDW-CV	12.8 %	MFR	12.4 %	
PDW	11.1 fL	HFR	4.3 %	
MPV	9.6 fL	RET-He	31.5 pg	
P-LCR	21.9 %	IPF	2.5 $10^9/L$	1.3 %
PCT	0.0019 L/L			
NRBC	0.00 $10^9/L$			
	0.0/100 WBC			

Alarma(s) en leucocitos (WBC)

Linfocitosis

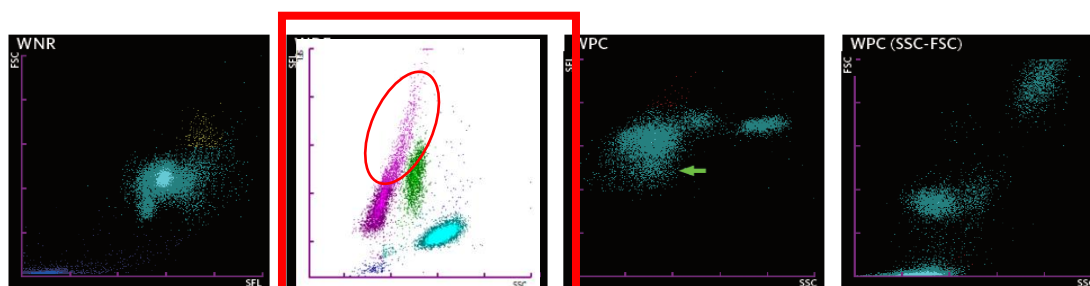
Monocitosis

Basofilia

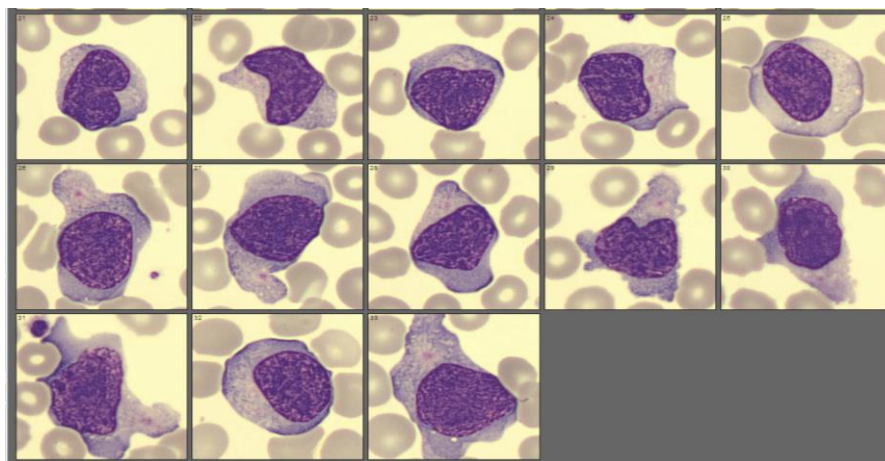
Linfocitos atípicos?

Alarma(s) en hematias (RBC)

Alarma(s) en plaquetas (PLT)



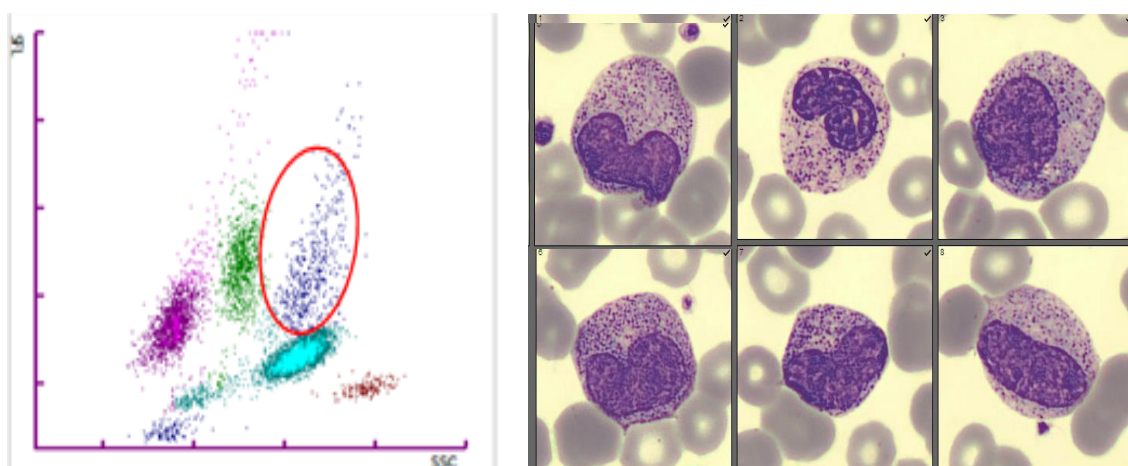
En el escatergrama WDF aparece una población de señales que parece una extensión de la población LYMPHO (en rosa), en la dirección de alta intensidad de fluorescencia (circulo rojo). XN-Series Clinical Case Report Vol. First edition, First print: August 2011.



Linfocitos reactivos en la Mononucleosis infecciosa.

■ GRANULOCITOS INMADUROS

Para detectar su presencia XE emplea los diagramas de dispersión DIFF e IMI. En el diagrama DIFF se agrupan encima de los neutrófilos, mostrando mayor fluorescencia conforme mayor inmadurez en la serie mieloide. En el canal IMI se representa como una nube de puntos rosa diferenciada del grupo de leucocitos maduros. El XN emplea solamente el canal DIFF para evidenciar su presencia. La alarma que generan ambos analizadores es “IG presence?”.



Poblaciones leucocitarias representadas en el diagrama de dispersión DIFF (imagen izquierda). Granulocitos inmaduros en un paciente con sepsis (imagen derecha).

3.2 ESTUDIO DE ESTABILIDAD

El **segundo estudio** es un análisis de estabilidad de los parámetros del hemograma en las condiciones habituales de trabajo, es decir, en el laboratorio de rutina y junto con el resto de muestras de sangre que entran diariamente al área de Hematimetría.

3.2.1 Muestras

Se eligieron de manera aleatoria 300 muestras de sangre total anticoaguladas con EDTA de pacientes a lo largo de 6 meses. En el estudio de la serie leucocitaria de las 300 muestras, 16 fueron excluidas por haber dado algún error durante su análisis o por presentar resultados atípicos tras haber sido analizados por el test Q de Dixon; en el estudio de la serie roja y plaquetar se excluyeron 34 por las mismas causas. No se requirió el consentimiento informado del paciente por no haberse incluido pruebas diferentes a las requeridas en la petición médica.

Este estudio no incluye el análisis de muestras a 4°C de temperatura, pues el objetivo es simular las condiciones habituales de trabajo en el laboratorio core donde se realiza este estudio, es decir, a temperatura ambiente.

Previo al análisis, se realizó un examen visual y se excluyeron del estudio muestras lipémicas o hemolizadas con el fin de evitar posibles interferencias. Todas las muestras fueron procesadas en el mismo analizador con el fin de disminuir la variabilidad inter-instrumental y con el mismo personal técnico.

3.2.2 Metodología

Se analizaron las muestras recién llegadas al laboratorio (<90 minutos tras venopunción), considerando su momento de análisis como el tiempo t_{0h} . Se volvieron a analizar las muestras en intervalos de 2 horas hasta las 12 horas tras su llegada al laboratorio.

Los resultados se transformaron en sus correspondientes porcentajes, considerándose la concentración obtenida a tiempo 0 horas (X_0) como el 100%. El cambio de concentración producido en ellas (X_t) en cada uno de los tiempos respecto al valor inicial (X_0) se expresa como cambio porcentual ($X_t\%$).

Para el estudio de estabilidad se siguieron 3 criterios de evaluación diferentes:

- *Criterio metrológico* según la variación analítica interdía.
- *Criterio metrológico* según la variación analítica intraindividual.
- *Criterio biológico* según la variación biológica intraindividual.

3.2.3 Análisis Estadístico

El análisis estadístico detallado es el siguiente:

a) Imprecisión

Se utilizaron los mismos datos que en el estudio de comparación de métodos, pero, además de los parámetros de recuento convencionales se analizaron los parámetros de investigación del analizador XN-2000.

b) Estabilidad

Se calculó el promedio del cambio porcentual ($\bar{X}_t\%$) de los recuentos o señales a su llegada al laboratorio (t_{0h}) y a cada tiempo mediante la siguiente fórmula:

$$\bar{X}_t\% = (X_t/X_0) \times 100$$

La estabilidad se evaluó utilizando el valor de $\bar{X}_t\%$ en cada parámetro según tres criterios:

b. 1) Criterio metrológico según variación analítica interdía (CVb)

El parámetro a evaluar se considera estable si su $\bar{X}_t\%$ no supera el cambio significativo mínimo (**CSMb** = $\pm 1.65 \cdot CVb\%$). CVb% se obtuvo de material de control calidad nivel intermedio XN-CHECK de Roche Diagnostics previamente analizado en primer estudio de intercambiabilidad (página 52).

b.2) Criterio metrológico según variación analítica intra-día (CVw)

El parámetro a evaluar se considera estable si su $\bar{X}_t\%$ no supera el cambio significativo mínimo (**CSMw** = $\pm 1.65 \cdot CVw\%$). CVw% fue obtenido de pacientes sanos y con patología analizados 10 veces consecutivas según directrices de la ICSH (48) y que ha sido previamente analizado en el primer estudio de intercambiabilidad (página 52).

b.3) Criterio biológico según variación biológica intraindividual (CVD)

El parámetro a evaluar se considera estable si su $\bar{X}_t\%$ no supera el cambio significativo deseable (**CSD** = $\pm 0,5 \cdot CVD\%$). CVD% fue obtenido del estudio publicado por Ricos et al. (42).

A continuación, se calculó el porcentaje medio de desviación (D%) para aquellos parámetros que sufrieron cambios significativos con la siguiente fórmula:

$$D(\%) = ((\bar{X}_{t_i} - X_{t_0}) / X_{t_0}) \times 100$$

Para, a continuación, calcular su promedio mediante:

$$\bar{D}(\%) = (\sum_{i=1}^n D_i(\%)) / n.$$

Finalmente, se calculó el factor de corrección mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Factor} = 1 - ((\bar{D}_i(\%) / 100)$$

Este factor de corrección puede incluirse en el software del analizador para corregir la señal de aquellos parámetros que sufren alteraciones significativas a partir de cierta hora tras la llegada al laboratorio.

TRABAJS PUBLICADOS

VII. TRABAJOS PUBLICADOS

Primer artículo original

Título: *Local verification between the hematological analyzers Sysmex XN-series and XE-5000.*

Introducción: El objetivo de este estudio fue realizar una verificación del analizador de hematología Sysmex XN-2000 comparándolo con el anterior XE-5000. Este estudio evaluó la imprecisión y el arrastre en el XN-2000, el error sistemático entre ambos analizadores según el criterio de variabilidad biológica deseable, así como un estudio comparativo de alarmas.

Revista: International Journal of Laboratory Hematology (Factor impacto 2016:2,03. Q3-44/70).

Segundo artículo original

Título: *Stability of leukocyte research parameters over time on the Sysmex XN: How to quantify the changes in cell morphology*

Introducción: Los parámetros de investigación de la serie Sysmex XN proporcionan información sobre la morfología celular. El objetivo es cuantificar los cambios dependientes del tiempo en los parámetros convencionales y de investigación. Asimismo, se propone el cálculo de un factor de corrección en aquellos parámetros que sufren alteraciones significativas por pérdida de estabilidad.

Revista: International Journal of Laboratory Hematology (Factor impacto 2018: 2,073. Q3-52/70).

Tercer artículo original

Título: *Red blood cells and platelets conventional and research parameters: stability remarks before their interpretation. A method to quantify and correct time-dependent changes*

Introducción: En este estudio se analiza la estabilidad de los parámetros convencionales y de investigación en hematíes, reticulocitos y plaquetas, con el fin de cuantificar los cambios morfológicos que experimentan en función del tiempo. Finalmente se calcula un factor de corrección aplicable a todos aquellos parámetros que sufren alteraciones significativas en la estabilidad.

Revista: Laboratory Medicine (Factor de impacto 2019: 1.084. Q4-23/29).

1. PRIMER ARTÍCULO

1.1 ARTÍCULO ORIGINAL



Local verification between the hematological analyzers Sysmex XN-series and XE-5000

I. PÉREZ*, M. E. REDÍN*, A. VIVES*, A. GARRIDO*, E. URRECHAGA†, M. LACASTA*

*Laboratory Medicine, Core Laboratory, University Hospital Donostia, Guipuzcoa, Spain

†Laboratory Hospital Galdakao Usansolo, Galdakao, Vizcaya, Spain

Correspondence:

Irene Pérez Casas, University Hospital Donostia, Laboratory Medicine, Paseo Dr. Beguiristáin s/n 20014 San Sebastián, Spain.
Tel.: +34 943007000 ext. 3520;
Fax: +34 943007063;
E-mail: irene.perez.casas@gmail.com

doi:10.1111/ijlh.12478

Received 27 October 2015;
accepted for publication 12 January 2016

Keywords

Sysmex, laboratory automation, biological variability, statistics, comparability

SUMMARY

Introduction: The aim of this study was to perform a verification of the hematology analyzer Sysmex XN-2000 by comparing with the previous XE-5000. This study assessed the precision and carryover on the XN-2000 and the systematic error between the both counters according to desirable biological variability criterion and a flag comparison study.

Methods: Within-run precision and between-batch precision were measured according to the ICSH guidelines. A comparative study was performed analyzing two hundred and six samples of peripheral blood from patients. The statistical study was conducted using the Passing–Bablok and Bland–Altman analyses. The leucocyte flag comparison was made by measuring the efficiency rate.

Results: Between-batch precision was lower than that recommended by the biological variability criterion and manufacturer specifications. The comparison gave nonagreement results for neutrophil and basophil counts according to the criterion of biological variability. Erythroblasts and immature granulocytes showed nonagreement, but there is no available biological variation database for these parameters to compare with. Nevertheless, excellent absolute agreement was found for red blood cell parameters, and for platelet, lymphocyte, monocyte, and eosinophil counts.

Conclusions: The global results obtained for the precision, comparability, and efficiency provide a satisfactory integration of the XN-2000 in the core laboratory routine and accomplish an optimal reliability.

INTRODUCTION

Before integrating a new clinical diagnostic analyzer, a study of evaluation methods must be carried out. If the measurement procedure between the currently

used analyzer and the new one is the same and even both analyzers are provided by the same manufacturer, a less extensive verification can be carried out [1]. In this case, the manufacturer's claims of precision should be confirmed, a comparative study should

be performed, and the sensitivity and specificity of abnormal cell flags should be tested using fresh human whole blood samples (including normal and abnormal samples) to provide information about the interchangeability of the results in order to avoid changes in the clinical decisions made during the evolution of a patient.

New parameters that are useful in clinical diagnosis and in improving their efficiency are being introduced for the technical development of hematological analyzers [2]. Sysmex technology employs several techniques for the quantitative analysis of the blood, such as radio frequency or flow cytometry with semiconductor laser [3]. Sysmex XN (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) series is the new generation of hematology analyzers designed to improve the accuracy and specificity [4]. The improvements in XN-series include the following: (i) optic-fluorescent analysis specific for platelets; (ii) high-sensitivity screening in the initial CBC + DIFF (count and differential) values, attached to the new channel WPC for precursors of white cells to reduce the number of slide revisions; (iii) the count of basophils and erythroblasts; (iv) immature granulocytes (IG) automated and specific mode to samples with very low counts of leukocytes (WBC); and (v) NRBC (erythroblasts) with each blood count performed, IG with each differential count, and IRF (immature reticulocyte fraction) and RET-He (reticulocyte hemoglobin equivalent) with each analysis of reticulocyte IPF (immature platelet fraction) with each count of platelets (fluorescent analysis).

Approximately two thousand and five hundred EDTA blood samples are analyzed per day through five blood hematology analyzers arranged in line in the core laboratory where we performed this study of verification. This study included the Sysmex XE-5000, which is the reference analyzer used in routine, and the Sysmex XN-2000, which is the new analyzer that was evaluated to improve the workflow and efficiency.

This study aimed to (i) assess the precision and carryover of the new XN-2000; (ii) make a comparison of measurement procedures to study the systematic error between both analyzers; and (iii) check the sensitivity and specificity of the lymphocyte flags in blood smear microscopic examination.

MATERIALS AND METHODS

Study population

This study was approved by the Ethics Committees from the University Hospital Donostia. The study population comprised two hundred and eighty patients: ten patients to measure the within-run precision, ten to carryover study, and two hundred and sixty to the comparative study. Sample analysis was carried out between May and October 2014, and blood samples from patients were selected after the analysis requested by the medical application made covering the entire analytical reportable range and a wide variety of blood disorders.

Precision

Within-run precision and between-batch precision were measured for white blood cell (WBC), red blood cell (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), mean cell volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), and platelet (PLT), mean corpuscular hemoglobin (MCH), erythroblast (NRBC), reticulocyte (RET) and differential leukocyte counts [neutrophil (NEU%), lymphocyte (LINPH%), monocyte (MONO%), eosinophil (EO%), basophil (BASO%) and immature granulocyte (IG%)].

Ten peripheral blood samples were selected to measure the within-run precision. Sample selection criterion was set according to the guidelines of the International Council for Standardization in Haematology (ICSH) [1]. Samples were collected in BD Vacutainer® spray-coated K2EDTA tubes (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA), of which three were from hematological patients (with leukemia and altered values of leukocytes), two from patients with cancer (with altered platelet values), three from patients who had anemia (HGB < 70 g/L), and two from patients whose parameters were within the reference values. Each of these samples was processed separately ten consecutive times.

Three concentration levels (high, normal, and low) of quality control material XN-CHECK (Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Germany) were employed for between-batch precision measurement. For 30 days,

three concentration levels were analyzed in duplicate. For each level of quality control material, outlier data, standard deviation, and coefficient of variation of each parameter were calculated [5].

Carryover

To evaluate carryover, we used blood samples with high concentration in any one of the studied parameters (WBC, HGB, PLT, RET %, and NRBC %) followed by blood samples with low concentration of the same parameter according to the definition given by Broughton *et al.* [5]. For this purpose, a sample with high concentration (A1, A2, A3) and another with low concentration of the studied parameter (B1, B2, B3) were analyzed three consecutive times. The percentage of carryover was calculated with the following formula:

$$\text{Carryover \%} = [(B1 - B3)/(A3 - B3)] \times 100.$$

Comparability between XN-2000 and XE-5000

The comparison study lasted 1 month. Two hundred and sixty samples of whole blood samples collected in K2EDTA anticoagulant tubes were analyzed by the two analyzers in less than 2 h and within 3 h after blood collection. The ICSH guidelines for the evaluation of blood cell analyzer recommend less number of blood samples if the analyzer has been validated before, and an abbreviated verification of the conditions is enough to check the interchangeability [1]; thus, the reference method considered in this study is the equipment that is in use (XE-5000).

The origin of patients was variable: emergency areas ($n = 38$), intensive care ($n = 14$), Hematology ($n = 76$), Oncology ($n = 14$), and routine ambulatory ($n = 118$). Therefore, the blood samples came from patients with different diseases, such as cardiovascular disorders, sepsis, liver disease, immunosuppression, myeloma, leukemia, lymphoma, and thrombocytopenic disorders, and patients without disease.

To evaluate the population distribution, we excluded the outliers, and we calculated differences in normal distribution using the Kolmogorov–Smirnov test for each studied parameter. Afterward, the intraclass correlation coefficient (ICC) was calculated to initially verify the existence of absolute agreement.

Then, Passing–Bablok and Bland–Altman analyses were carried out to evaluate deeply the differences between analyzers according to the CLSI recommendations [6], considering the existence of significant proportional systematic error when it fulfills in both studies. This occurs when the confidence interval for the slope does not contain the value one in the Passing–Bablok regression and the confidence interval for the relative differences does not include the value zero in the Bland–Altman assessment [7]. If a significant proportional systematic error is found, it can be estimated as the mean value of the relative differences [8], which is represented in the Bland–Altman plots as the mean % of differences. Finally, the systematic error in the parameters was compared with the Desirable Biological Variation Database specifications.

The statistical program used for the Passing–Bablok regression and Bland–Altman analysis was MEDCALC[®] v10.2.0 (MedCalc Software, Ostende, Belgium).

Flagging performance

Both XE-5000 and XN-2000 detect altered lymphocytes through the WDF channel, warning the presence of abnormal lymphocytes, blasts and atypical lymphocytes. In addition, XN can differentiate abnormal lymphocytes from blasts using the WPC channel by means of a reflex test. We selected these types of cell flagging and immature granulocyte flags in order to check the capacity of the XN-series to reduce the high number of blood smears generated in our laboratory by measuring the overall efficiency. For this purpose, we selected 126 samples with several leukocyte flags and blood smear was performed by two observers to check the presence/absence of blast, abnormal lymphocytes, and immature granulocytes, considering their unified answer as the reference method.

Calculations for the assessment of sensitivity, specificity, and efficiency of leukocyte flag are indicated below, where the true positive, false positive, true negative, and false negative are represented as TP, FP, TN, and FN, respectively: (i) Sensitivity = $\frac{TP}{TP + FN} \times 100$; (ii) Specificity = $\frac{TN}{TN + FP} \times 100$; (iii) Efficiency = $\frac{TP + TN}{TP + FP + TN + FN} \times 100$.

Finally, the global efficiency of the flags was compared statistically using the McNemar test to find evidence of significant difference ($P < 0.05$).

RESULTS

Precision

Table 1 shows the results obtained in the within-run and between-batch precision measurements and the desirable specifications for imprecision expressed as the percentage coefficient of variance.

Within-run precision is specified by the results obtained in patients, with the objective of verifying the situation in which greater dispersion of the parameters occurs.

Carryover

The percentages of carryover in leukocytes, platelets, hemoglobin, erythroblasts, and reticulocytes are summarized in Table 2.

Comparability between XN-2000 and XE-5000

Two hundred and sixty samples were initially included. Then, the number of samples was reduced to 241, as the outlier cases and the cases affected by technical incidents were excluded.

The results obtained regarding cell counts by both analyzers compiled are given in Table 3. The two last columns of the table show the percentage of systematic error retrieved from the Bland–Altman analysis ($RDM\ \% = \text{relative differences mean percentage}$), and the objective limit of systematic error according to the biological variability criterion ($SEBV\ \%$) [9]. Analyzing the Passing–Bablok and Bland–Altman intervals and following the instructions as described in the Methods section, the parameters in which a systematic error occurs, the percentage of the difference, and whether it exceeds the target (represented by superscript *) can be deduced.

Flagging performance

Table 4 shows the flagging performance for blast, abnormal lymphocytes, atypical lymphocytes, and immature granulocytes verified in one hundred and seven blood smears. The XE-5000 employs a combined flag blast/abnormal lymphocyte; as a consequence, two types of results are in the same flag. To simplify the analysis, we compared statistically the

XE-5000 combined flag with the abnormal lymphocyte XN reflex flag, as it is technically different from that flag.

False-positive flags were checked counting one hundred cells covering the full smear. Blast and immature granulocyte flags that were true positive were considered when $\geq 1\%$. False positives in abnormal lymphocyte flag were considered when the Sézary cells, lymphoma cells, plasma cells, and hairy cells were not found in the blood smear (true positive when $> 1\%$). Atypical lymphocyte flags were considered false positive if reactive lymphocytes were $< 5\%$, counting one hundred cells covering the full smear. We found that the sensitivity for blast detection on the XN-2000 was 30% higher than that on the XE-5000. However, the specificity was very similar on the two analyzers, but global efficiency was significantly higher ($P > 0.05$) on the XN-2000.

In the case of abnormal lymphocyte flag, we observed a 15% higher sensitivity on the XE-5000. Nevertheless, the specificity showed better results on the XN-2000; therefore, the global efficiency was significantly better on the XN-2000.

The sensitivity, specificity, and efficiency rates obtained for atypical lymphocyte flag were very similar, and no significant difference was found between the two analyzers.

DISCUSSION

Within-run precision analysis highlights the greater dispersion of data occurring precisely in diseases in which the parameter is altered. Common trends arise in some parameters, such as NRBC, eosinophils, basophils, immature granulocytes, and reticulocytes, all with very high discrepancies. This situation is due to the very low percentage of these cells in the sample. Therefore, small variations in the count lead to high inaccuracies.

Briggs *et al.* [10] report similar results for erythroblasts, but there is no information regarding differential leukocyte count [11, 12]. So the within-run precision analysis, useful to check the repeatability of the method, provides little information on these parameters with wide dispersion.

Between-batch precision for the studied parameters is less than that in the desirable specification for precision, except for MCV, MCH, and MCHC. However,

Table 1. Results for within-run precision (CV_w %) and between-batch precision (CV_b %) on the XN-2000 using patient samples and quality controls with low (QC1), normal (QC2), and high (QC3) levels of concentration in red/white blood cell count, platelets and hemoglobin concentration. The average concentration of each parameter is given in parenthesis

	CV _w % and (Mean concentration)			CV _b % and (Mean concentration)			CV _{DBV} %
	Anemia	Leukemia	Oncology	Ref. values	QC1	QC2	QC3
WBC (10 ⁹ /L)	1.09 (9.64)	0.95 (21.74)	6.04 (0.26)	1.13 (5.11)	1.72 (3.20)	1.02 (7.05)	1.93 (16.54)
RBC (10 ¹² /L)	1.04 (2.23)	0.86 (2.81)	0.84 (2.60)	0.78 (4.09)	0.63 (2.38)	0.48 (4.40)	0.52 (5.38)
HGB (g/L)	1.01 (56.5)	0.62 (86.6)	0.64 (78.7)	0.74 (136.7)	0.97 (64.1)	0.52 (129.8)	0.67 (172.3)
HCT L/L	0.96 (0.188)	0.77 (0.262)	0.81 (0.212)	0.76 (0.399)	0.95 (0.186)	0.98 (0.373)	0.89 (0.486)
MCV (fL)	0.26 (87.42)	0.26 (93.51)	0.22 (81.39)	0.16 (97.45)	0.75 (78.14)	0.76 (84.75)	0.69 (90.42)
MCH (pg)	1.51 (26.73)	1.15 (30.88)	1.27 (30.27)	1.02 (33.41)	1.01 (26.96)	0.75 (29.49)	0.76 (32.06)
MCHC (g/L)	1.51 (299)	1.05 (330)	1.23 (372)	0.95 (343)	1.4 (345)	1.27 (348)	1.17 (355)
PLT (10 ⁹ /L)	1.30 (298.2)	1.41 (192.7)	4.54 (21.00)	0.91 (227.3)	5.28 (49.34)	2.25 (254.1)	1.83 (567.3)
NRBC (10 ⁹ /L)	53.69 (0.03)	49.50 (0.12)	80.28 (0.02)	66.64 (0.01)	7.1 (0.15)	3.44 (0.43)	3.44 (0.99)
NEUT (10 ⁹ /L)	1.06 (5.70)	4.50 (11.38)	9.09 (0.06)	1.95 (2.27)	1.79 (1.23)	1.65 (3.05)	1.83 (7.77)
LYMPH (10 ⁹ /L)	2.88 (2.56)	32.90 (4.17)	7.92 (0.12)	1.46 (2.26)	3.4 (1.05)	3.14 (1.96)	3.79 (4.03)
MONO (10 ⁹ /L)	3.48 (0.89)	26.54 (6.11)	13.21 (0.05)	5.61 (0.44)	6.80 (0.47)	6.99 (1.00)	7.95 (2.14)
EO (10 ⁹ /L)	13.82 (0.23)	57.65 (0.02)	47.97 (0.02)	11.10 (0.12)	5.3 (0.30)	6.83 (0.70)	7.20 (1.80)
BASO (10 ⁹ /L)	29.47 (0.04)	15.09 (0.05)	48.41 (0.01)	20.71 (0.03)	2.35 (0.15)	1.82 (0.34)	1.73 (0.79)
IG (10 ⁹ /L)	21.92 (0.09)	11.20 (2.03)	60.99 (0.01)	40.73 (0.01)	2.92 (0.32)	2.76 (0.78)	2.52 (1.97)
RET (10 ⁹ /L)	6.68 (122.1)	7.48 (34.24)	7.00 (36.63)	3.26 (96.49)	2.40 (121.7)	2.61 (98.93)	5.26 (50.67)

CV_{DBV} %, Desirable Biological Variation specifications; WBC, white blood cells; RBC, red blood cells; HGB, hemoglobin; HCT, hematocrit; MCV, mean cell volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; PLT, platelets; NRBC, nucleated red blood cells; NEUT, neutrophils; LYMPH, lymphocytes; MONO, monocytes; EO, eosinophils; BASO, basophils; IG, immature granulocytes; Ref. values, patients with reference values; –, unspecified.

the results obtained could be considered acceptable, because they meet the manufacturer specifications.

Carryover

The results obtained for the parameters analyzed showed a percentage within the range 0.0–0.42%. These results suggest a low percentage of carryover.

Table 2. Carryover using patients' blood samples with high cell counts followed by low cell counts

	WBC	PLT	HGB	NRBC	RET
% Carryover	0.04	0.18	0.00	0.00	0.42

Comparability data analysis

The Kolmogorov–Smirnov test showed a population with normal distribution only in the red blood cell parameters and neutrophils. The lack of normality in

white cell line and platelets could be explained by the high proportion of Hematology and Oncology patients included in the study (approximately 40%), of which many received blood transfusion with normal concentrations of erythrocytes but still with a differential count very distorted. Another disadvantage found during the collection of samples is the difficulty to obtain a wide variety of concentrations in some parameters like erythroblasts or immature granulocytes. Despite that, we have employed a complete statistical methodology to minimize the error and avoid misinterpretation.

Intraclass correlation coefficient shows an absolute agreement (ICCs > 0.75 have a high level of agreement [13]) in all the parameters, but the lowest agreement was found for NRBC, basophils, and immature granulocytes. These results show the initial suspicion that there are some differences between both analyzers, and require further investigation looking at the concentrations where these differences occur.

After the evaluation of the confidence intervals in the Passing–Bablok regression and their agreement

Table 3. Comparability study between XE-5000 and XN-2000

	Intraclass coefficient correlation (IC 95%)	Passing–Bablok		Bland–Altman		
		Regression line	IC 95% slope	IC 95% relative differences	RDM%	SE _{DBV} %
WBC (10 ⁹ /L)	0.995 (0.994–0.997)	$y = -0.0292 + 1.0645x$	1.058–1.069	4.813–5.659	5.2	6.05
RBC (10 ¹² /L)	0.996 (0.994–0.997)	$y = -0.1908 + 1.0577x$	1.048–1.068	0.086–0.587	0.3	1.77
HGB (g/L)	0.995 (0.954–0.998)	$y = -0.2473 + 1.0386x$	1.029–1.048	1.354–1.709	1.5	1.84
HCT L/L	0.983 (0.895–0.993)	$y = 0.3289 + 1.0070x$	0.991–1.028	1.229–1.755	1.1 ^{NS}	1.26
MCV (fL)	0.992 (0.969–0.997)	$y = -1.3797 + 1.0581x$	1.047–1.069	0.937–1.233	1.5 ^{NS}	1.74
MCH (pg)	0.966 (0.928–0.980)	$y = -1.1095 + 1.0476x$	1.011–1.081	0.856–1.401	1.1 ^{NS}	1.35
MCHC (g/L)	0.910 (0.885–0.929)	$y = -0.0000 + 1.0000x$	0.973–1.083	(−0.289)–0.226	0	0.40
PLT (10 ⁹ /L)	0.989 (0.985–0.992)	$y = -1.0690 + 1.0172x$	1.006 to 1.031	(−0.313)–2.276	0.9 ^{NS}	5.93
NRBC (10 ⁹ /L)	0.886 (0.855–0.912)	$y = -0.0022 + 0.9255x$	0.000 to 1.037	87.596–133.327	110.5	–
NEUT (10 ⁹ /L)	0.974 (0.938–0.987)	$y = 0.0008 + 1.084x$	1.075 to 1.094	10.115–13.166	11.6*	9.25
LYMPH (10 ⁹ /L)	0.996 (0.995–0.997)	$y = -0.0036 + 1.0651x$	1.056 to 1.074	1.454–5.699	3.6	9.19
MONO (10 ⁹ /L)	0.977 (0.969–0.982)	$y = -0.0017 + 1.0060x$	0.990 to 1.023	−5.176–4.259	−0.5 ^{NS}	13.20
EO (10 ⁹ /L)	0.994 (0.992–0.995)	$y = 0.0000 + 1.0558x$	1.040 to 1.078	−10.339–7.947	−1.2 ^{NS}	19.81
BASO (10 ⁹ /L)	0.818 (0.771–0.856)	$y = 0.0019 + 1.2429x$	1.140 to 1.345	15.156–36.027	25.5*	15.38
IG (10 ⁹ /L)	0.859 (0.775–0.906)	$y = 0.0046 + 1.5850x$	1.504 to 1.670	60.414–78.055	69.2	–

RDM%, relative differences mean; SE_{DBV}%, Systematic error biological variation specifications; WBC, white blood cells; RBC, red blood cells; HGB, hemoglobin; HCT, hematocrit; MCV, mean cell volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; NRBC, nucleated red blood cells; NEUT, neutrophils; LYMPH, lymphocytes; MONO, monocytes; EO, eosinophils; BASO, basophils; IG, immature granulocytes; –, unspecified; NS, nonsignificant bias; *Bias higher than the objective of biological variation specification.

Table 4. Comparison of blasts, abnormal lymphocyte, atypical lymphocyte, and immature granulocyte flagging between the XE-5000 and XN-2000

	True positive	False positive	True negative	False negative	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Efficiency (%)	McNemar
Blasts								
XN-2000	15	19	87	5	75.0	82.1	80.9	$P < 0.05$
XE-5000	6	16	91	13	31.6	85.0	77.9	
Abnormal lymphocyte								
Abnormal lymphocyte	19	5	87	15	55.9	94.6	84.1	$P < 0.05$
XN-2000								
Abnormal lymphocyte/lymphoblast*	24	20	72	10	70.6	78.3	76.2	
XE-5000								
Atypical lymphocytes								
XN-2000	13	25	75	13	50.0	75.0	69.8	$P > 0.05$
XE-5000	15	32	68	11	57.7	68.0	65.9	
Immature granulocytes								
XN-2000	36	17	56	17	67.9	76.7	73.0	$P > 0.05$
XE-5000	35	12	61	18	66.0	83.6	76.2	

*Combined flag in XE-5000 and XN-2000 (XN-2000 after a reflex test resolves the combined flag as abnormal lymphocyte or blast flag). Statistical differences ($P < 0.05$).

with those obtained in the analysis of Bland–Altman [14], we found a significant proportional systematic error in the counts of leukocytes, red blood cells, hemoglobin, NRBC, basophils, and immature granulocytes, although this difference was greater than the specifications of biological variability only for neutrophils and basophils. In general, the systematic error is positive; that is, the cell counts are higher in XN-2000 than in XE-5000.

Despite not being specified in the biological variability criterion, the results suggest that NRBC and immature granulocytes present no agreement between analyzers, in part because of the improvements in the XN-series.

Despite not providing confidence intervals for the straight-line regression or Bland–Altman analysis, Seo *et al.* [4] have recently confirmed that the correlation is not excellent in some parameters, being more pronounced in basophils and immature granulocytes.

We have selected the most interesting Passing–Bablok and Bland–Altman charts (Figure 1). For example, hemoglobin concentration charts in Figure 1a show higher quantitations on the XN-2000. Nevertheless, the degree of agreement for the platelet

counts is very high as presented in Figure 1b, but there are some exceptional points which represent great differences between the two analyzers due to the very low count of these cells in the sample. We have not made a detailed comparative study with low platelet counts between the two analyzers, although other studies [15, 16] showed greater accuracy for the XN-2000 with low platelet counts because of the fluorescence platelet channel, which is relevant in making the appropriate clinical decisions regarding transfusions in patients with thrombocytopenic disorders.

Neutrophil charts (Figure 1c) suggest that the XN-2000 detects and quantitates neutrophils in concentrations closer to the limit of detection, while the XE-5000 does not. This situation occurs when the count of neutrophils is lower than 10%.

The higher specificity rates for blast and abnormal lymphocyte flags confirm the best efficiency on the XN-2000. This advantage could improve the core laboratory workflow where this study was carried out. However, we have not found a significant improvement in the detection of atypical lymphocytes and immature granulocytes on the XN-2000.

To conclude, the global results obtained for the precision, comparability, and efficiency provide a sat-

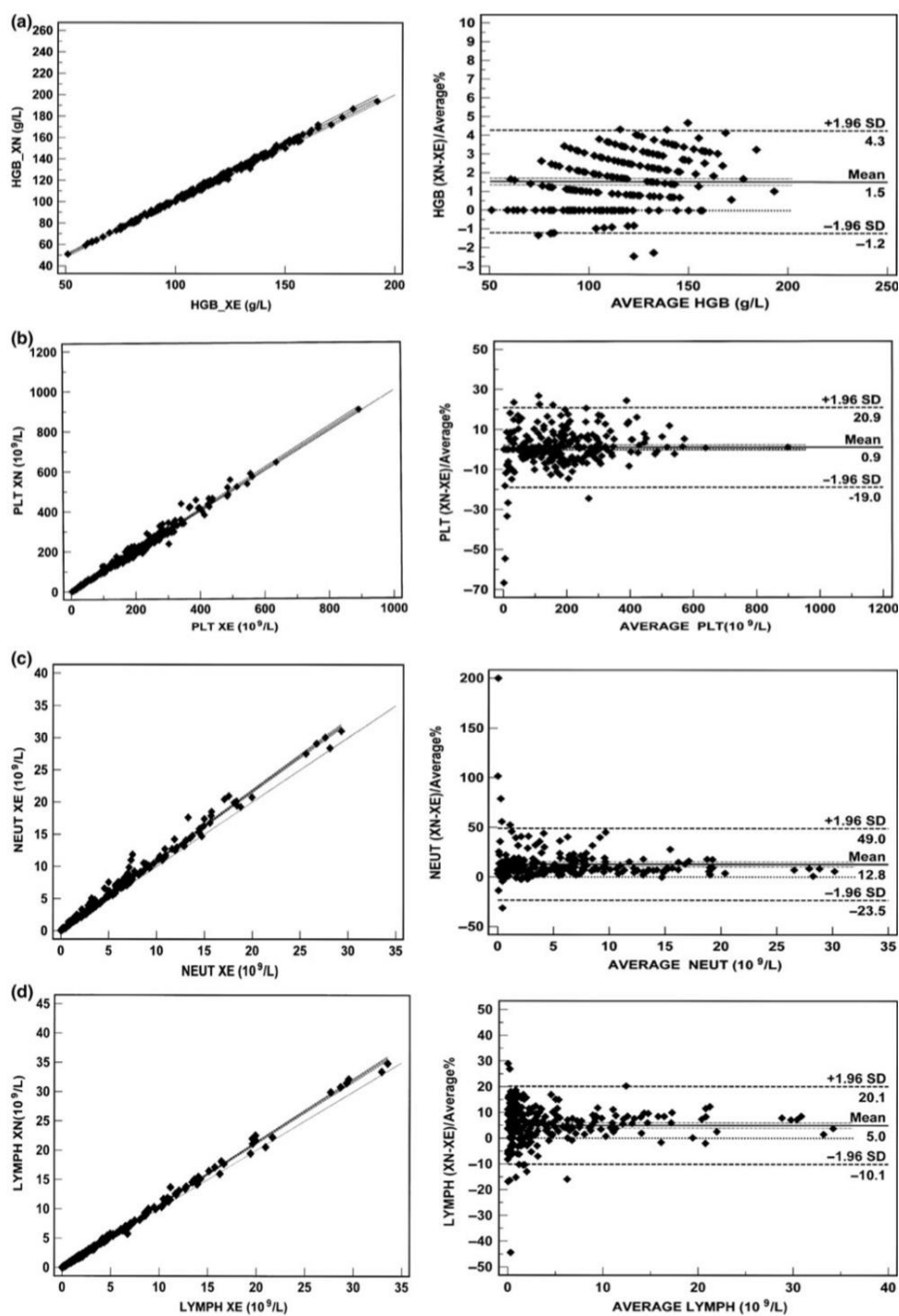


Figure 1. Passing–Bablok and Bland–Altman plots. Figures (a), (b) and (d) represent the high degree of agreement in hemoglobin concentration and platelet and lymphocyte counts, in contrast to the low degree of agreement in the neutrophil count in figure (c), which shows a positive bias.

isfactory integration (acceptability) of the XN-2000 in the core laboratory routine and accomplish an optimal reliability.

ACKNOWLEDGEMENTS

Irene Pérez wrote the manuscript. Maria Elena Redín designed the research. Irene Pérez and Maria Elena

Redín performed the research. Asunción Vives interpreted the data. Eloísa Urrechaga translated the manuscript into English language and revised it critically. Adolfo Garrido critically revised and approved the final version of the manuscript. Miren Lacasta contributed to acquisition and analysis of data.

REFERENCES

1. ICSH WG, Briggs C, Culp N, Davis B, d'Onofrio G, Zini G, Machin SJ. ICSH guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting. *Int J Lab Hematol* 2014;36:613–27.
2. Kang SH, Kim HK, Ham CK, Lee DS, Cho HI. Comparison of four hematology analyzers, CELL-DYN Sapphire, ADVIA 120, Coulter LH 750, and Sysmex XE-2100, in terms of clinical usefulness. *Int J Lab Hematol* 2008;30:480–6.
3. Ruzicka K, Veitl M, Thalhammer-Scherrer R, Schwarzingen I. The new hematology analyzer Sysmex XE-2100: performance evaluation of a novel white blood cell differential technology. *Arch Pathol Lab Med* 2001;125:391–6.
4. Seo JY, Lee ST, Kim SH. Performance evaluation of the new hematology analyzer Sysmex XN-series. *Int J Lab Hematol* 2014;37:155–64.
5. Broughton PM, Gowenlock AH, McCormack JJ, Neill DW. A revised scheme for the evaluation of automatic instruments for use in clinical chemistry. *Ann Clin Biochem* 1974;11:207–18.
6. CLSI. Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline, 3rd edn. CLSI Document EP09-A3 Wayne, PA: CLSI; 2013.
7. Pineda P, Prada E, Prieto S. Métodos Estadísticos en la Comparación de Equipos de Laboratorio. Asociación Española de Biopatología Médica AEBM. 2015; Available at: <http://www.aebm.org/publicaciones-y-documentos/publicaciones-de-la-aebm.html>.
8. Gella FJ. Protocolos de evaluación de sistemas analíticos. In: Actualización en la Selección y Evaluación de Sistemas Analíticos. Martínez M, Prieto B, Torres J. (eds). Barcelona: Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular; 2013: 55–83.
9. Minchinela J, Ricós C, Perich C, Fernández-Calle P, Álvarez V, Domenech M, Simón M, Biosca C, Boned B, Cava F, García-Lario J-V, Fernández-Fernández MA. Biological variation database, and quality specifications for imprecision, bias and total error (desirable and minimum). The 2014 update. <https://www.westgard.com/biodatabase-2014-update.htm> 2014.
10. Briggs C, Longair I, Kumar P, Singh D, Machin SJ. Performance evaluation of the Sysmex haematology XN modular system. *J Clin Pathol* 2012;65:1024–30.
11. Inaba T, Nomura N, Ishizuka K, Yoshioka K, Takahashi M, Yuasa S, Saito K, Fujitomo Y, Nakanishi M, Fujita N. Basic evaluation of Pentra MS CRP, a new automated hematology analyzer for rapid 5-part WBC differential and CRP using a small volume of whole blood. *Int J Lab Hematol* 2014;37:208–16.
12. Hotton J, Broothaers J, Swaelens C, Cantiniaux B. Performance and abnormal cell flagging comparisons of three automated blood cell counters: cell-Dyn Sapphire, DxH-800, and XN-2000. *Am J Clin Pathol* 2013;140:845–52.
13. Martínez Morillo E, Gella Tomás FJ, Alonso Nieva N, Boned Juliani B, Canalfías Reverter F, Izquierdo Álvarez S, Serrat Orus N. Recomendaciones para el estudio de la veracidad en el laboratorio clínico mediante la comparación de procedimientos de medida. Documentos de la SECQ 2011 (3) 2011.
14. Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res* 1999;8:135–60.
15. Park SH, Park CJ, Kim MJ, Han MY, Lee BR, Cho YU, Jang S. The Sysmex XN-2000 hematology autoanalyzer provides a highly accurate platelet count than the former Sysmex XE-2100 system based on comparison with the CD41/CD61 immunoplatelet reference method of flow cytometry. *Ann Lab Med* 2014;34:471–4.
16. Tanaka Y, Tanaka Y, Gondo K, Maruki Y, Kondo T, Asai S, Matsushita H, Miyachi H. Performance evaluation of platelet counting by novel fluorescent dye staining in the XN-series automated hematology analyzers. *J Clin Lab Anal* 2014;28:341–8.

In the article by Pérez I et al¹ the regression line equation of the parameters hematocrit (HCT), hemoglobin (HGB) and mean cell volume (MCV) is incorrect. The correct Table 3 should be:

TABLE 3 Comparability study between XE-5000 and XN-2000

	Intraclass coefficient correlation (IC 95%)	Passing Bablock		Bland Altman		
		Regression line	IC 95% slope	IC 95% relative differences	RDM%	SE _{DBV} %
WBC (10 ⁹ /L)	0.995 (0.994-0.997)	$y = -0.0292 + 1.0645x$	1.058-1.069	4.813-5.659	5.2	6.05
RBC (10 ¹² /L)	0.996 (0.994-0.997)	$y = -0.1908 + 1.0577x$	1.048-1.068	0.086-0.587	0.3	1.77
HGB (g/L)	0.995 (0.954-0.998)	$y = -2.4730 + 1.0386x$	1.029-1.048	1.354-1.709	1.5	1.84
MCV (fL)	0.983 (0.895-0.993)	$y = 0.3289 + 1.0070x$	0.991-1.028	1.229-1.755	1.1 ^{NS}	1.26
HCT (L/L)	0.992 (0.969-0.997)	$y = -0.0137 + 1.0581x$	1.047-1.069	0.937-1.233	1.5 ^{NS}	1.74
MCH (pg)	0.966 (0.928-0.980)	$y = -1.1095 + 1.0476x$	1.011-1.081	0.856-1.401	1.1 ^{NS}	1.35
MCHC (g/L)	0.910 (0.885-0.929)	$y = -0.0000 + 1.0000x$	0.973-1.083	(-0.289)-0.226	0	0.40
PLT (10 ⁹ /L)	0.989 (0.985-0.992)	$y = -1.0690 + 1.0172x$	1.006-1.031	(-0.313)-2.276	0.9 ^{NS}	5.93
NRBC (10 ⁹ /L)	0.886 (0.855-0.912)	$y = -0.0022 + 0.9255x$	0.000-1.037	87.596-133.327	110.5	-
NEUT (10 ⁹ /L)	0.974 (0.938-0.987)	$y = 0.0008 + 1.084x$	1.075-1.094	10.115-13.166	11.6 ^a	9.25
LYMPH (10 ⁹ /L)	0.996 (0.995-0.997)	$y = -0.0036 + 1.0651x$	1.056-1.074	1.454-5.699	3.6	9.19
MONO (10 ⁹ /L)	0.977 (0.969-0.982)	$y = -0.0017 + 1.0060x$	0.990-1.023	-5.176 to 4.259	-0.5 ^{NS}	13.20
EO (10 ⁹ /L)	0.994 (0.992-0.995)	$y = 0.0000 + 1.0558x$	1.040-1.078	-10.339 to 7.947	-1.2 ^{NS}	19.81
BASO (10 ³ /uL)	0.818 (0.771-0.856)	$y = 0.0019 + 1.2429x$	1.140-1.345	15.156-36.027	25.5 ^a	15.38
IG (10 ⁹ /L)	0.859 (0.775-0.906)	$y = 0.0046 + 1.5850x$	1.504-1.670	60.414-78.055	69.2	-

RDM%, relative differences mean; SE_{DBV}%, Systematic error biological variation specifications; WBC, white blood cells; RBC, red blood cells; HGB, hemoglobin; HCT, Hematocrit; MCV, mean cell volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; NRBC, nucleated red blood cells; NEUT, neutrophils; LYMPH, Lymphocytes; MONO, Monocytes; EO, Eosinophils; BASO, Basophils; IG, Immature granulocytes; -, unspecified; NS, not significant bias.

^aBias higher than the objective of biological variation specification.

Nevertheless, the conclusions and the estimations written in our publication are correct as they have been obtained from the original results in the units of measurement of our laboratory. The author apologizes for this error.

REFERENCE

1. Pérez I, Redín ME, Vives A, et al. Local verification between the hematological analyzers Sysmex XN-series and XE-5000. *Int Jnl Lab Hem*. 2016;38:256-264. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12478>.

1.2 ANÁLISIS DEL ARTÍCULO EN CASTELLANO

1.2.1 Resultados

Imprecisión

En la tabla 1 del artículo original se adjuntan los resultados obtenidos en la imprecisión intradía, interdía y especificaciones deseables expresados como CV%.

La imprecisión intradía viene determinada por los resultados obtenidos en los pacientes que han sido utilizados para su cálculo, con el objetivo de comprobar en qué situación se produce mayor dispersión de los parámetros.

Arrastre

El porcentaje de arrastre obtenido en leucocitos, plaquetas, hemoglobina, eritroblastos y reticulocitos queda recogida en la tabla 2 del artículo original.

Comparación de métodos

De las 260 muestras de pacientes de partida, tras estudio de casos aberrantes y eliminación de casos en los que se produjeron incidencias técnicas se han utilizado finalmente para el estudio de comparación de métodos un total de 241 muestras de pacientes.

En la tabla 3 del artículo original quedan recogidos los resultados obtenidos correspondientes al recuento de celularidad realizado por ambos analizadores. Las dos últimas columnas de la tabla muestran el porcentaje de error sistemático obtenido mediante gráficos de Bland Altman ($RDM\% = \text{Porcentaje de diferencias relativas}$) y, a continuación, el límite de porcentaje de error sistemático deseado según la especificación de la variabilidad biológica ($SE_{DEV}\%$). De este modo podrá deducirse en qué parámetros se ha producido error sistemático, si éste supera al esperado y en cuánto porcentaje se diferencian.

Validez diagnóstica de alarmas

La Tabla 4 del artículo original muestra la comparación de alarmas entre analizadores para blastos, linfocitos anormales, linfocitos atípicos y granulocitos inmaduros en 126 frotis de sangre. El XE-5000 emplea una alarma combinada Blast/Abnormal lympho, es decir, dos tipos de resultados están en la misma alarma. Para simplificar el análisis hemos comparado estadísticamente la alarma combinada del XE-5000 con la alarma refleja de linfocitos anormales del XN, a pesar de no ser técnicamente la misma alarma.

Se comprobaron las muestras que dieron alarmas contando cien células por cada frotis. Se consideraron las alarmas de linfocitos anormales como verdaderos positivos a todas aquellas muestras en las que, tras recuento al microscopio, se contabilizaron $\geq 1\%$ de las siguientes células: células de Sézary, células de linfoma, células plasmáticas y tricoleucocitos (falsos positivos cuando $< 1\%$ de estas células). En cuanto a las alarmas de blastos y granulocitos inmaduros, se consideraron verdaderos positivos a todas aquellas muestras en las que se encontraron blastos o granulocitos inmaduros $\geq 1\%$. Las alarmas de linfocitos atípicos se consideran falsos positivos si los linfocitos reactivos son $< 5\%$.

Encontramos que la sensibilidad para la detección de blastos en el XN-2000 es un 30% más alta que en el XE-5000. Sin embargo, la especificidad fue muy similar en los dos analizadores; aún así, la eficiencia global fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en el XN-2000.

En el caso de la alarma de linfocitos anormales, observamos un 15% de sensibilidad más alta en el XE-5000. Sin embargo, la especificidad mostró mejores resultados en el XN-2000, por lo que la eficiencia global fue significativamente mejor en el XN-2000.

Las tasas de sensibilidad, especificidad y eficiencia obtenidas para la alarma de linfocitos atípicos y granulocitos inmaduros fueron muy similares y no se encontraron diferencias significativas entre los dos analizadores ($P > 0.05$).

1.2.2 Discusión

Imprecisión

La imprecisión interserial en los parámetros de estudio es inferior al esperado por la especificación de la variabilidad biológica, excepto en el volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media y concentración hemoglobina corpuscular media. Sin embargo, comparar estos parámetros según criterios de variabilidad biológica es muy estricto, por lo que consideramos que los resultados de imprecisión obtenidos no tienen relevancia clínica.

La imprecisión intradía pone de manifiesto que la mayor dispersión de los datos se produce en patologías en las que se encuentra precisamente alterado el parámetro. Se deduce un comportamiento común en algunos parámetros, como en NRBC%, EOS%, BASO%, IG% y RET%: todos presentan imprecisiones muy elevadas. Esta situación se debe a que el porcentaje de estas células en la muestra es muy bajo, por lo que pequeñas variaciones en el recuento hacen que en el cálculo se produzcan imprecisiones elevadas. De modo que la imprecisión intradía, que sirve para comprobar la repetibilidad del método, aporta poca información en estos parámetros en los que se observa tanta dispersión.

Arrastre

Los resultados obtenidos en los parámetros analizados mostraron un porcentaje de arrastre dentro del rango 0.0-0.42%. Por lo tanto, puede concluirse que el analizador XN-2000 no manifiesta arrastre de células entre análisis de muestras.

Comparación de métodos

Tras haber evaluado los intervalos de confianza de la regresión de Passing Bablock y su concordancia con los obtenidos en el análisis de diferencias de Bland Altman, se observa diferencia significativa en algunos parámetros. De este modo, puede confirmarse la presencia de error sistemático proporcional en WBC, RBC, HGB, VCM, NEU%, MONO%, BASO% y IG%, si bien, esta diferencia fue superior al de las especificaciones de variabilidad biológica sólo en el caso de NEU% y BASO%. Por lo general, el error sistemático es de signo positivo, es decir, los recuentos celulares son mayores en XN-2000 que en XE-5000, a excepción del MONO% en el que el nuevo analizador ha contado menor porcentaje de células que en el XE-5000.

Los eritroblastos y granulocitos inmaduros, a pesar de no estar aún evaluados en la especificación de la variabilidad biológica, parece ser que no presentan correlación alguna; podría ser debido a una de las nuevas mejoras de la serie XN que es capaz de realizar recuentos más fiables y sensibles para IG y eritroblastos.

En la figura 1 del artículo original se observa la diferencia en el recuento de neutrófilos que se origina entre ambos analizadores. Del gráfico de Bland Altman y de la tabla 3 se deduce lo siguiente:

- XN-2000 detecta y cuantifica neutrófilos a concentraciones cercanas al límite de detección, mientras que XE-5000 no. Esta situación se produce cuando el recuento de neutrófilos es inferior al 10%, es ahí donde mayor diferencia existe entre ambos analizadores. Lo que significa que XN-2000 es más sensible para recuentos bajos de neutrófilos que el XE-5000.
- XN-2000 no guarda correlación alguna con XE-5000 en el porcentaje de basófilos. La diferencia es de signo positivo, lo que significa que XN-2000 hace un recuento mayor de basófilos que el XE-5000.

Validez diagnóstica de alarmas

Para las alarmas de linfocitos anormales y blastos la especificidad es mayor en el XN-2000, lo cual confirma que este analizador es más eficiente para este tipo

de alarmas. Esta ventaja podría mejorar el flujo de trabajo del laboratorio central donde se realiza este estudio. Sin embargo, no hemos encontrado una mejoría significativa en la detección de linfocitos atípicos y granulocitos inmaduros en el XN-2000.

1.2.3 Conclusiones

- La imprecisión interserial del autoanalizador Sysmex XN-2000 cumple con las especificaciones de variabilidad biológica.
- La imprecisión intradía en cualquier paciente es muy elevada para los eritroblastos, eosinófilos, basófilos y granulocitos inmaduros.
- El porcentaje de arrastre fue inferior al 0.5%, es decir, no existe arrastre de células entre análisis de muestras.
- El error sistemático proporcional (RDM%) que muestra XN-2000 con XE-5000 es de signo positivo y supera al error sistemático de la especificación de la variabilidad biológica ($SE_{DBV}\%$) en el caso del volumen corpuscular medio, porcentaje de neutrófilos y porcentaje de basófilos, posiblemente debido a los avances tecnológicos de la nueva serie Sysmex XN. Sin embargo, parámetros que sí han mostrado muy buena correlación han sido el hematocrito, recuento de plaquetas y porcentaje de linfocitos y eosinófilos.
- De manera global, el XN-2000 mostró mejores resultados en la detección de alarmas.

2. SEGUNDO ARTÍCULO

2.1 ARTÍCULO ORIGINAL

Received: 20 December 2017 | Accepted: 1 May 2018

DOI: 10.1111/ijlh.12866



ORIGINAL ARTICLE

WILEY

ISLH
International Journal of
Laboratory Hematology

Stability of leukocyte research parameters over time on the Sysmex XN: How to quantify the changes in cell morphology

I. Pérez* | M. E. Redín*

*Laboratory Medicine, Core Laboratory,
University Hospital Donostia, Guipuzcoa,
Spain

Correspondence

Irene Pérez Casas, Laboratory Medicine,
University Hospital Donostia, Paseo Dr.
Beguiristain, s/n 20014 San Sebastian,
Guipuzcoa, Spain.
Email: irene.perez.casas@gmail.com

Abstract

Introduction: Research parameters of the Sysmex XN-series provide information about the cell morphology. The aim is to quantify time-dependent changes of conventional and research parameters and propose correction factors to be applied to the parameters, which revealed significant changes.

Methods: 284 EDTA blood samples were processed from 0 hours-12 hours and the mean percentage change ($\bar{X}_t\%$) of the leukocyte parameters was calculated. Stability was evaluated according to three criteria: metrology criteria according to the between-batch analytical variation, metrology criteria according to within-run analytical variation, by which $\bar{X}_t\%$ could not exceed the Minimum Significant Change ($MSC = [\pm 1.65 \cdot CV\%]$) and Biological criteria based on intraindividual biological variation, by which $\bar{X}_t\%$ could not exceed the Desirable Significant Change ($DSC = [\pm 0.5 \cdot CV_D\%]$). Mean deviation percentage of the parameters, which suffer significant changes was calculated and a multiplying factor was obtained to correct the signal deviation. Stability of abnormal leukocyte flags was also evaluated.

Results: Most of the cell count parameters are considered stable according to MSC and DSC. However, several research parameters of neutrophils and lymphocytes show alterations in stability after 4 hours, even when their respective cell count parameters are stable.

Conclusion: Morphological variations of neutrophils and lymphocytes can be quantified. This data can be used to correct the deviation in samples that cannot be analyzed before 4 hours.

KEYWORDS

changes in cell morphology, leukocyte research parameters, NE-SSC, stability after venipuncture, Sysmex XN

1 | INTRODUCTION

One of the factors which introduces greater uncertainty on the pre-analytic phase is the time elapsed between the venipuncture and the sample analysis. This time period has been analyzed and defined together with temperature conditions by the International Council for Standardization in Haematology (ICSH) for different parameters of the hemogram.¹ However, due to the great variability of the results,

which are in many cases dependent on the analyzer,² it is important to know the requirements of stability according to specific diagnostic applications.³ Thus, we will find specific stability conditions for prospective epidemiological studies in biobanks,^{4,5} anti-doping studies⁶⁻⁸ or clinical diagnosis of haematological disorders.

Time elapsed between the venipuncture and the analysis of the sample is frequently over 2 hours in the clinical practice of laboratories; especially when the extraction and the processing of the

sample do not take place in the same facilities and samples are sent over to centralized laboratories.

Blood cells inside EDTA anticoagulated tubes can survive a short period of time. They still are metabolically active and suffer *in vitro* changes during a certain time after the venipuncture. Some patient inherent cell alterations can be confused with other alterations that occur in a spontaneous manner during the sample storage. For the diagnosis of haematological disorders it is vital to keep both quantitative parameters and morphological characteristics of the patient cells in order to reach a real diagnosis.

On the other hand, some haematological analyzers can perform a more detailed study of the cells based on the research parameters. In some studies, these parameters are used as auxiliary information for the diagnosis of some pathologies. Despite the quantifiable information about cell stability that they can provide, these parameters are not used frequently in clinical labs.

The aim of this study is to quantify time-dependent changes of conventional and research parameters that offer quantitative information about cell morphology and propose correction factors to be applied to these parameters.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Specimens (Blood samples)

A total of 284 blood samples anticoagulated in Vacutainer® spray-coated K2EDTA tubes were selected randomly from a total sample collection obtained from patients during 6 months. Prior to the analysis, a visual inspection was carried out so lipemic or hemolyzed samples could be excluded from the study in order to avoid possible interferences.

Blood collection is scheduled between 8-10 A.M and the samples are sent to the laboratory. The precise time of extraction is not recorded and therefore we have to assume a deviation in the measurement of data. However, in order to reference properly the time-dependent changes over time the set-point (t_{0h}) has been considered at the time of arrival when the samples are analyzed for the first time.

From the arrival to laboratory and their initial analysis (t_{0h}) the samples were re-processed 6 times a day in 2 hours intervals at room temperature. All samples were processed in the same analyzer and with the same technical personnel to reduce the instrumental variability.

This study represents the usual processing conditions in our core laboratory. This is the reason why only room temperature analysis is included.

No patient authorization was required as the same samples had already been analyzed and communicated to the clinician applicants. All samples were treated as anonymous and were used for the same analysis purpose as the original medical request for which they were obtained.

2.2 | Principle of measurement

Cell analysis was made on the Sysmex XN 20 analyzer based on the principle of flow cytometry using a semiconductor laser ($\lambda = 633 \text{ nm}$). After cells interact with the laser beam the analyzer classifies cells

using three types of signals: (i) side fluorescent light (SFL), (ii) forward scattered light (FSC) and (iii) side scattered light (SSC). The intensity of the side fluorescent light reflects the type and amount of nucleic acids and cell organelles. The intensity of the FSC and the SSC reflects cell surface structure, particle shape, nucleus form, refractive index and reflectivity of the cells.⁹ The larger cell and more complex intracellular structures contains, the stronger will be FSC and SSC signals.

2.3 | Analysis channels

2.3.1 | WDF channel

This channel counts white blood cells and performs a differential counting of neutrophils, lymphocytes, monocytes, and eosinophils. Qualitatively detects the presence of atypical lymphocytes, abnormal lymphocytes, and blasts.

2.3.2 | WNR channel

This channel counts white blood cells and performs a differential counting of basophils and nucleated red blood cells.

2.3.3 | WPC channel

This channel counts white blood cells and detects blasts and abnormal cells of the lymphocyte series.

2.4 | Research parameters

This study analyzes some conventional parameters along with some parameters considered research parameters. Even if research parameters are not used commonly they can provide specific and complementary information for the diagnosis of some diseases. However, at the present time, there is no External Quality Assessment scheme for the research parameters and thus these are currently for research use only. Table 1 shows the meanings of each of the research parameters.

2.5 | Statistical analysis

2.5.1 | Precision

During 30 days L2-XN CHECK quality control material (Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Germany) was analyzed in duplicate to calculate between-batch precision (CV_b). To quantify within-run precision (CV_w) ten peripheral blood samples from patients were processed separately ten consecutive times, according to the guidelines of the International Council for Standardization in Haematology (ICSH).¹⁰ Blood samples were collected in K2EDTA tubes from patients with leukemia, anemia, platelet disorders and patients whose parameters were within reference values. Finally, the mean of the global data was calculated to obtain the CV_w of each parameter. Intraindividual precision (CV_p) were obtained from the Desirable Biological Variation Database specifications.¹¹

TABLE 1 Conventional and research parameters meanings

Parameters	Meanings	Analysis channel
WBC-N	WBC count calculated from the WNR channel	WNR
TCN-N	The total nuclear cell count (WBC + NRBC) calculated from the WNR channel	
BA-N	The basophil counts calculated from the WNR channel	
WBC-D	WBC count calculated from the WDF channel	WDF
TNC-D	The total nuclear cell count (WBC + NRBC) calculated from the WDF channel	
HFLC%	The ratio of the count of the upperlymph area of the WDF scattergram to the WBC count	
BA-D	The basophil counts calculated from the WDF channel	
NEUT	Neutrophil count	
NE-SSC	The lateral scattered light intensity of the NEUT area on the WDF scattergram	
NE-SFL	The fluorescent light intensity of the NEUT area on the WDF scattergram	
NE-FSC	The forward scattered light intensity of the NEUT area on the WDF scattergram	
NE-WX	The lateral scattered light distribution width of the NEUT area on the WDF scattergram	
NE-WY	The fluorescent light distribution width of the NEUT area on the WDF scattergram	
NE-WZ	The forward scattered light distribution width of the NEUT area on the WDF scattergram	
LYMPH	Lymphocyte count	
LY-X	The lateral scattered light intensity of the LYMPH area on the WDF scattergram	
LY-Y	The fluorescent light intensity of the LYMPH area on the WDF scattergram	
LY-Z	The forward scattered light intensity of the LYMPH area on the WDF scattergram	
LY-WX	The lateral scattered light distribution width of the LYMPH area on the WDF scattergram	
LY-WY	The fluorescent light distribution width of the LYMPH area on the WDF scattergram	
LY-WZ	The forward scattered light distribution width of the LYMPH area on the WDF scattergram	
MONO	Monocyte count	
MO-X	The lateral scattered light intensity of the MONO area on the WDF scattergram	
MO-Y	The fluorescent light intensity of the MONO area on the WDF scattergram	
MO-Z	The forward scattered light intensity of the MONO area on the WDF scattergram	
MO-WX	The lateral scattered light distribution width of the MONO area on the WDF scattergram	
MO-WY	The fluorescent light distribution width of the MONO area on the WDF scattergram	
MO-WZ	The forward scattered light distribution width of the MONO area on the WDF scattergram	
EO	Eosinophil count	
IG	Immature granulocyte count	
WBC-P	WBC calculated from the WPC channel	WPC
TNC-P	The total nuclear cell count (WBC + NRBC) calculated from the WPC channel	

Principle of measurement: Flow cytometry method using semiconductor laser in the channels WNR, WDF and WPC.

2.5.2 | Stability of leukocytes

Mean percentage change ($\bar{X}_t\%$) of the leukocyte parameters was calculated at initial time (t_{0h}) corresponding to the arrival time at the laboratory and at different hours after the arrival (t_i) with the next formula: $\bar{X}_t\% = (x_i/x_0) \cdot 100$. The stability was evaluated according to three criteria: (i) *Metrology criteria according to between-batch*

analytical variation (CV_b), by which $\bar{X}_t\%$ could not exceed the minimum significant change interval ($MSC-b = [\pm 1.65 \cdot CV_b]$). (ii) *Metrology criteria according to within-run analytical variation* (CV_w), by which $\bar{X}_t\%$ could not exceed the minimum significant change interval ($MSC-w = [\pm 1.65 \cdot CV_w]$). (iii) *Biological criteria based on intraindividual biological variation* (CV_D), by which $\bar{X}_t\%$ could not exceed the desirable significant change interval ($DSC = [\pm 0.5 \cdot CV_D]$).

TABLE 2 White blood cells stability study on the Sysmex XN reprocessing EDTA whole blood samples at different hours (h)

	Precision (%)		Stability intervals according to different criteria				Percentage mean change (\bar{X}_t)						
	CV _b	CV _w	CV _D	MSC-b	MSC-w	DSC	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
WBC-N (10 ³ /μL)	1.62	1.16	5.73	97.3-102.7	98.1-101.9	97.1-102.9	100	99.9	100	99.8	99.8	99.7	100.1
WBC-D (10 ³ /μL)	2.07	1.08	5.73	96.6-103.4	98.2-101.8	97.1-102.9	100	99.8	99.7	99.8	99.5	99.4	99.7
WBC-P (10 ³ /μL)	2.28	1.78	5.73	96.2-103.8	97.1-102.9	97.1-102.9	100	99.1	98.4	98.8	97.9	98.6	98.1
HFLC % (>0.5%)	Ø	18.05	—	Ø	70.2-129.8		100	94.9	98.6	90.6	90.3	83.2	77.4
TNC-N (10 ³ /μL)	1.59	1.89	—	97.4-102.6	96.9-103.1		100	99.9	100.2	100	100	99.9	102.1
TNC-D (10 ³ /μL)	2.07	0.85	—	96.6-103.4	98.6-101.4		100	99.8	99.8	99.9	99.7	99.7	99.9
TNC-P (10 ³ /μL)	2.28	1.78	—	96.2-103.8	97.1-102.9		100	99.5	99.2	99.4	98.9	99.9	98.9
NEUT (10 ³ /μL)	2.63	0.78	8.55	95.7-104.3	98.7-101.3	95.7-104.3	100	99.9	100.2	99.9	99.9	99.9	100.4
NE-SSC	0.36	0.27	—	99.4-100.6	99.5-100.5		100	99.7	99.4 ^w	99.3 ^{b,w}	99.2 ^{b,w}	99.1 ^{b,w}	98.9 ^{b,w}
NE-SFL	4.7	0.93	—	92.2-107.8	98.5-101.5		100	100	100	99.9	99.8	99.6	99.9
NE-FSC	3.33	3.41	—	98-102	98.6-101.4		100	100.7	101.2	101.5 ^w	101.6 ^w	102.1 ^{b,w}	102.3 ^{b,w}
NE-WX	1.2	0.82	—	96.2-103.8	95.9-104.1		100	101.4	101.8	103.1	103.7	104.2 ^{b,w}	104.5 ^{b,w}
NE-WY	2.29	2.51	—	94.5-105.5	94.4-105.6		100	99.4	99.6	99.8	100.5	100.2	100.1
NE-WZ	3.46	3.79	—	94.3-105.7	93.7-106.3		100	100.1	101.1	101.7	102.7	104.7	107.4 ^{b,w}
LYMPH (10 ³ /μL)	5.94	3.41	5.1	90.2-109.8	94.4-105.6	97.5-102.6	100	99.6	99.5	98.8	99.1	98.6	98.7
LY-X (ch)	1.68	1.3	—	97.2-102.8	97.9-102.1		100	100	100.3	100.2	100.3	100.4	100.7
LY-Y (ch)	3.16	1.12	—	94.8-105.2	98.2-101.8		100	98.7	98.1 ^w	98.1 ^w	97.9 ^w	97.8 ^w	98.5
LY-Z (ch)	1.72	0.47	—	97.2-102.8	99.2-100.8		100	99.6	99.9	100	100.3	100.1	100.5
LY-WX	3.76	2.52	—	93.8-106.2	95.8-104.2		100	100.5	100.7	100.1	100.5	100.3	100.3
LY-WY	6.53	1.62	—	89.2-110.8	97.3-102.7		100	101.4	101.7	100.8	100.6	101	100
LY-WZ	5.44	2.51	—	91-109	95.9-104.1		100	101.6	103	103.6	104.8 ^w	104.3 ^w	104.1 ^w
MONO (10 ³ /μL)	10.5	7.27	8.75	82.7-117.3	88-112	95.6-104.4	100	100.4	100.2	99.4	99	98.6	99.2
MO-X	2.11	3.79	—	96.5-103.5	93.7-106.3		100	99.9	99.9	100	100.2	100.1	100.2
MO-Y	4.87	3.43	—	92-108	94.3-105.7		100	98.5	98.2	98.4	98.4	98.3	99.3
MO-Z	4.17	4.42	—	93.1-106.9	92.7-107.3		100	100	100.9	101	101.3	102.1	102.5
MO-WX	6.64	3.85	—	89-111	93.7-106.3		100	101.1	101.3	100.4	101.5	102.2	102.3
MO-WY	12.16	7.85	—	79.9-120.1	87-113		100	101	102	104.2	101.9	104.3	103.6
MO-WZ	7.04	9.12	—	88.4-111.6	85-115		100	99.4	99.4	98.5	99.5	98.7	100.9

(Continues)

TABLE 2 (Continued)

	Precision (%)			Stability intervals according to different criteria			Percentage mean change (\bar{X}_t)						
	CV _b	CV _w	CV _D	MSC-b	MSC-w	DSC	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
EO (10 ³ /μL)	8.13	11.98	10.5	86.6-113.4	80.2-119.8	94.8-105.3	100	100.9	102.5	104.4	104.1	108.7 ^D	109.7 ^D
BA-N (10 ³ /μL)	2.96	25.23	14	95.1-104.9	58.4-141.6	93-107	100	109.8 ^{a, D}	111.7 ^{b, D}	116.0 ^{b, D}	116.0 ^{b, D}	115.3 ^{b, D}	120.6 ^{b, D}
BA-D (10 ³ /μL)	5.39	25.42	14	91.1-108.9	58.1-141.9	93-107	100	108.7 ^D	115.0 ^{b, D}	119.8 ^{b, D}	117.4 ^{b, D}	116.7 ^{b, D}	116.5 ^{b, D}
IG (10 ³ /μL)	3.28	11.18	—	94.6-105.4	81.5-118.5	—	100	87.6 ^b	87.1 ^b	85.7 ^b	84.8 ^b	84.6 ^b	92.6 ^b

The parameters abbreviations are explained in the Table 1; CV_b: between-batch precision; CV_w: within-run precision; CV_D: Desirable biological variation specifications; MSC: minimum significant change, DSC: desirable significant change; Superscripts ^{b,w}: exceed metrological criteria based on ^b: between-batch analytical variation; ^w: within-run analytical variation. Superscript ^D: exceed biological criteria based on intraindividual biological variation; Ø: quality control material XN CHECK has not High Fluorescence Cells; —: unspecified in any data source.

Based on this analysis we selected the parameters which \bar{X}_t value changed significantly over time and applied the next formula to calculate the percentage of deviation (D%) with respect to the initial time: $D_i(\%) = ((X_{t_i} - X_{t_0}) / X_{t_0}) \times 100$. Then we calculated the mean deviation(%) as $\bar{D}(\%) = (\sum_{i=1}^n D_i(\%)) / n$ and obtained a multiplying factor with the next formula: Factor = $1 - ((\bar{D}(\%) / 100)$. It is important to include the sign of the mean deviation (%) in this formula. This factor is an approximation and we recommend that each laboratory calculates and evaluates their own data. The multiplying factor can be used to correct the value of the signal of those parameters that suffer alterations due to time after venipuncture.

2.5.3 | Flags of abnormal leukocytes

Leukocytes flags included in this study are "Left shift", "Blasts-Abnormal Lympho" and "Atypical Lympho". The presence/absence of these flags were noted at initial time (t_{0h}) and at different hours from each of the 284 patients analyzed in the stability leukocyte study explained above. No blood smears have been carried out to verify the flags, thus we considered the flags noted at the initial time of analysis (t_{0h}) as the true value. Calculations for the assessment of sensitivity and specificity of leukocyte flags are indicated below, where the true positive, false positive, true negative and false negative are represented as TP, FP, TN and FN respectively: (i) Sensitivity = $\frac{TP}{TP+FN} \times 100$; (ii) Specificity = $\frac{TN}{TN+FP} \times 100$. Statistical analysis carried out was a GEE Model of binomial family with logit transformation using STATA 14.2.

3 | RESULTS

Out of the thirty-two study parameters shown in Table 2, eleven suffered significant changes in stability. Six out of these eleven parameters showed instability after 4 hours post-laboratory arrival. The cell counting parameters which showed the poorest stability characteristics are the basophils and the immature granulocytes. The research parameters that reported the most noncompliance of the stability criteria were those derived from neutrophils and lymphocytes. On the contrary, the monocytes seemed to show the best stability behavior both in cellular counting and research parameters.

In the Table 3 are gathered all the parameters which suffer significant changes and the time after the initial analysis (t_{0h}) from which it happens. Correction factor obtained could be included in the Sysmex XN software.

In the flags study of the 284 patients, 217 patients from t_{0h} to t_{12h} did not trigger any flags in any of the analysis performed over time. This means that 76% of the patients had the same negative result in every analysis. Statistical analysis shows that there are no significant changes time-dependent. Table 4 shows the results.

4 | DISCUSSION

There are several hemogram stability parameter studies in bibliography. They basically differ from each other on the final goal of the measurement. This study focuses on the samples obtained from hospitalized patients and outpatients.

TABLE 3 Multiplier factor to apply in parameters which suffer significant changes from the initial analysis (t_{0h})

	Mean deviation (%)	Factor	Time
NE-SSC	-0.820	1.008	≥4 h
NE-FSC	1.875	0.981	≥6 h
NE-WX	4.350	0.957	≥10 h
NE-WZ	7.400	0.926	≥12 h
LY-Y (ch)	-2.025	1.020	≥4 h
LY-WZ	4.400	0.956	≥8 h
EO ($10^3/\mu\text{L}$)	9.200	0.908	≥10 h
BA-N ($10^3/\mu\text{L}$)	14.900	0.851	≥2 h
BA-D ($10^3/\mu\text{L}$)	15.683	0.843	≥2 h
IG ($10^3/\mu\text{L}$)	-12.933	1.129	≥2 h

Correction factor could be included in the analyzer software in samples not analyzed immediately. Time: express the hour (h) from which is necessary to apply the factor.

Samples have been processed at room temperature, usual condition in our core laboratory. Counting of leukocytes (WBC) and total nuclear cell (TNC) show good stability characteristics in all three channels. As the study sample is the same, the results suggest that any of the three kind of reagents and analysis channels behave the same in terms of stability.

In general, it can be observed that cellular counting parameters are not affected by time (≤ 12 hours) with the exception of the lowest cell counts such as basophils, immature granulocytes, and Eosinophils. In these cell counts, small concentration changes create large data dispersion. It could be interesting to include samples with high concentration of these parameters in order to check that they follow the same stability behavior. Nevertheless, we selected the tubes randomly with the exception of the initial visual inspection to avoid lipemic, icteric and hemolytic samples. Within all the research parameters that report intensity and amplitude of cellular dispersion, it can be observed that monocytes do not show any variation on the dispersion signal, which means that their morphology and cellular content is stable even after 12 hours after the initial analysis.

The intensity of lateral dispersion and forward dispersion (NE-SSC & NE-FSC) of the area of the neutrophils seem to be within the parameters that suffer greater variation after 4 hours from the initial analysis. As we mentioned above, the FSC signal is stronger for larger cells, and the SSC signal becomes stronger as the intracellular structures become more complex.⁹ NE-SSC is a granularity measurement,

TABLE 4 Stability flag study over time

	True positive	False positive	True negative	False negative	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Left-Shift						
2 h	11	0	270	3	78.6	100
4 h	13	0	270	1	92.9	100
6 h	11	0	270	3	78.6	100
8 h	12	0	270	2	85.7	100
10 h	13	0	270	1	92.9	100
12 h	11	0	270	3	78.6	100
Blast						
2 h	14	1	269	0	100	99.6
4 h	14	3	267	0	100	98.9
6 h	14	4	266	0	100	98.5
8 h	13	0	270	1	92.9	100
10 h	14	0	270	0	100	100
12 h	11	0	270	3	78.6	100
Atypical Lymho						
2 h	18	0	164	2	90	100
4 h	20	0	264	0	100	100
6 h	17	0	264	3	85	100
8 h	19	0	264	1	95	100
10 h	18	0	264	2	90	100
12 h	16	0	264	4	80	100

Sensitivity and specificity of flags overtime. Flags noted at initial time of analysis (t_{0h}) is considered the true value. Statistical data suggest that flags are not affected over time.

meaning that higher levels correspond to greater granularity values and lower levels correspond to hypogranularity. Hyper-granularity in neutrophils can occur either in reactive infectious processes or in inflammatory processes. Several studies have analyzed the relation between augmented values of NE-SSC and other biochemical markers with the aim of predicting sepsis,¹²⁻¹⁴ especially when it comes to immunocompromised patients whose leukocyte levels can be diminished.

Although a patient manifests neutrophilia, if these neutrophils are large, hypogranulated and rigid the migratory response triggering the failure of the immune response could be reduced. In accordance with this approach, Zonneveld et al¹⁵ conclude in the necessity of creating a diagnose algorithm together with some other biomarkers that allow the identification of a clinically relevant hyperactivated septic neutrophil phenotype that can be discriminated from other neutrophil phenotypes associated with local inflammation or resting conditions.

On the other hand, hypogranularity of neutrophils is a sign of dysplasia that can be observed in Myelodysplastic syndrome (MDS). Previous studies have published the utility of the parameter NE-SSC at low levels in combination with the presence of cytopenias and/or monocytosis as smear revision criteria¹⁶⁻¹⁸ in order to increase the detection of MDS or chronic myelomonocytic leukemia (CMML).

In the results of our study, we can observe that the percentage mean change ($\bar{X}_t\%$) in the parameter NE-SSC in Table 2 decreases over time. This means that the granularity decreases significantly after 4 hours. This can bring us to two different scenarios: (i) False negatives in patients where the auxiliary parameter NE-SSC is used to check if the active process corresponds to an infectious or an inflammatory process; (ii) false positives in healthy patients that show a false hypogranularity in the neutrophils in combination with other cytopenias that will require an extra smear. In the first scenario information that can be worth to have in the follow-up of patients in critical care units, post surgical or chemotherapy treatments will be lost. In the second, the increase in smear production increases the workmanship and costs of the laboratory with no value added.

This study can be useful in laboratories where NE-SSC parameter is used as a diagnosis support tool and for those where there is an elapsed time between the venipuncture and the processing of the samples. The proposal is to include a multiplying factor in the dispersion signal of parameter NEUT-SSC to all those samples for which the elapsed time between the extraction and the processing is greater than 4 hours. This factor could eventually be programmed in the Software of the analyzer to be automatically included in all the samples that have been collected at a certain time and have not been processed before 4 hours. However, this factor is not useful when the samples require a blood smear examination to describe in detail the cellular morphology for a clinical diagnosis, as good practices recommend that blood smears should be made as soon as possible^{3,19} after blood collection.

Neutrophil forward scattered light intensity (NE-FSC) also suffers significant changes after 6 hours from the initial analysis.

Results suggest that neutrophils become bigger cells over time. If we observe the Table 3, NE-FSC has 1.875% of deviation from the initial time, this means neutrophils after 6 hours increase their size almost 2%. However, it is not clear if this behavior has any clinical application or if it can be useful for other studies. We have been surprised by the stability of parameter NE-SFL, this may suggest that the type and amount of nucleic acids and cell organelles are stable over time.

In the case of lymphocytes, the parameter LY-Y suffers significant stability changes after 4 hours from the initial time of analysis. In this parameter, the intensity signal decreases around 2% and the variation could be observed in the smear as other previous studies have proved.²⁰

In Figure 1, it is represented how the neutrophil research parameters suffer significant changes whereas the neutrophil count remains stable over time. In the same figure, it is represented the decrease in the lymphocyte fluorescence signal (LY-Y) in comparison with the rest of the lymphocyte parameters that are more stable.

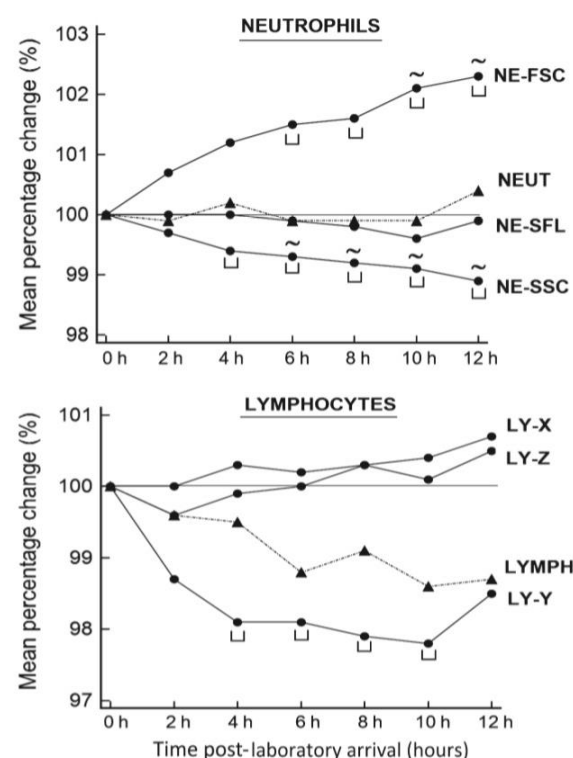


FIGURE 1 Stability study at room temperature of neutrophils and lymphocytes research parameters. NE-FSC: neutrophil forward scattered light intensity; NEUT: neutrophil count; NE-SFL: neutrophil fluorescence light intensity; NE-SSC: neutrophil lateral scattered light intensity; LY-X: lymphocyte lateral scattered light intensity; LY-Z: lymphocyte forward scattered light intensity; LYMPH: lymphocyte count; LY-Y: lymphocyte fluorescence light intensity. Symbols around the points: □ and ~ exceed metrological criteria based on within-run and between-run analytical variation respectively

Specificity of the leukocyte flags (Table 4) is very high, due to the high number of samples with negative flags ($n = 217$), thus the sample of study is not very heterogeneous. Apparently, the worst sensitivity appears in the Left-Shift flag which informs about the immature granulocytes. However, there is not a clear trend over time. Statistical analysis suggests that there are no significant differences time-dependent in the new appearance or disappearance of leukocyte flags.

To conclude, the research parameters of neutrophils and lymphocytes that inform about the morphology of the cells suffer significant time-dependent changes. These changes can be observed by visual inspection of the blood smear, but so far no quantitative assessment has been performed by means of research parameters. A multiplying factor can be applied to correct these variations and be included in the Software of the analyzer.

ACKNOWLEDGEMENTS

Irene Pérez designed the study, performed the research, interpreted the data and wrote the manuscript. Maria Elena Redín interpreted the data, added improvements in the mathematical analysis and critically revised the manuscript.

ORCID

I. Pérez  <http://orcid.org/0000-0001-7132-6794>

REFERENCES

1. Tatsumi N, Miwa S, Lewis SM, et al. Specimen collection, storage, and transmission to the laboratory for hematological tests. *Int J Hematol*. 2002;75:261-268.
2. Imeri F, Herklotz R, Risch L, et al. Stability of hematological analytes depends on the hematology analyser used: a stability study with Bayer Advia 120, Beckman Coulter LH 750 and Sysmex XE 2100. *Clin Chim Acta*. 2008;397:68-71.
3. Zini G, International Council for Standardization in Haematology (ICSH). Stability of complete blood count parameters with storage: toward defined specifications for different diagnostic applications. *Int J Lab Hematol*. 2014;36:111-113.
4. Peakman TC, Elliott P. The UK Biobank sample handling and storage validation studies. *Int J Epidemiol*. 2008;37(Suppl 1):i2-i6.
5. Elliott P, Peakman TC, UK Biobank. The UK Biobank sample handling and storage protocol for the collection, processing and archiving of human blood and urine. *Int J Epidemiol*. 2008;37:234-244.
6. Robinson N, Giraud S, Schumacher YO, Saugy M. Influence of transport and time on blood variables commonly measured for the athlete biological passport. *Drug Test Anal*. 2016;8:199-207.
7. Robinson N, Kirchbichler A, Banuls O, et al. Validation of a blood stability score as an easy-to-use blood sample quality index. *Int J Lab Hematol*. 2016;38:685-693.
8. Robinson N, Sottas PE, Pottgiesser T, Schumacher YO, Saugy M. Stability and robustness of blood variables in an antidoping context. *Int J Lab Hematol*. 2011;33:146-153.
9. Matsushita H, Tanaka Y. Sysmex XN-series automated hematology analyzer. *Clin Case Rep*. 2011;1:83.
10. International Council for Standardization in Haematology, Writing Group, Briggs C, Culp N, et al. ICSH guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting. *Int J Lab Hematol*. 2014;36:613-627.
11. Minchinela J, Ricós C, Perich C, et al. Biological variation database, and quality specifications for imprecision, bias and total error (desirable and minimum). The 2014 update. <https://www.westgard.com/biodatabase-2014-update.htm> 2014.
12. Zimmermann M, Steenhuis P, Linssen J, Weimann A. Detection and quantification of hypo- and hypergranulated neutrophils on the new Sysmex XN hematology analyzer: establishment of an adapted reference interval for the neutrophil-granularity-intensity compared to XE-technology in adult patients. *Clin Lab*. 2015;61:235-241.
13. Zimmermann M, Cremer M, Hoffmann C, Weimann K, Weimann A. Granularity Index of the SYSMEX XE-5000 hematology analyzer as a replacement for manual microscopy of toxic granulation neutrophils in patients with inflammatory diseases. *Clin Chem Lab Med*. 2011;49:1193-1198.
14. Luo Y, Lin J, Chen H, Zhang J, Peng S, Kuang M. Utility of neut-X, neut-Y and neut-Z parameters for rapidly assessing sepsis in tumor patients. *Clin Chim Acta*. 2013;422:5-9.
15. Zonneveld R, Molema G, Plotz FB. Analyzing neutrophil morphology, mechanics, and motility in sepsis: options and challenges for novel bedside technologies. *Crit Care Med*. 2016;44:218-228.
16. Furundarena JR, Araiz M, Uranga M, et al. The utility of the Sysmex XE-2100 analyzer's NEUT-X and NEUT-Y parameters for detecting neutrophil dysplasia in myelodysplastic syndromes. *Int J Lab Hematol*. 2010;32:360-366.
17. Le Roux G, Vlad A, Eclache V, et al. Routine diagnostic procedures of myelodysplastic syndromes: value of a structural blood cell parameter (NEUT-X) determined by the Sysmex XE-2100. *Int J Lab Hematol*. 2010;32(6 Pt 1):e237-e243.
18. Goel S, Sachdev R, Gajendra S, et al. Picking up myelodysplastic syndromes and megaloblastic anemias on peripheral blood: use of NEUT-X and NEUT-Y in guiding smear reviews. *Int J Lab Hematol*. 2015;37:e48-e51.
19. Brunning RD, Orazi A, Germing U, et al. Myelodysplastic syndromes/neoplasms, overview. In: Swerdlow EH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, eds. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: WHO; 2008:88-93.
20. Vives-Corrons J, Briggs C, Simon-Lopez R, et al. Effect of EDTA-anticoagulated whole blood storage on cell morphology examination. A need for standardization. *Int J Lab Hematol*. 2014;36:222-226.

How to cite this article: Pérez I, Redín ME. Stability of leukocyte research parameters over time on the Sysmex XN: How to quantify the changes in cell morphology. *Int J Lab Hem*. 2018;00:1-8. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12866>

2.2 ANÁLISIS DEL ARTÍCULO EN CASTELLANO

2.2.1 Resultados

De los 32 parámetros de estudio recogidos en la tabla 2 del artículo original, 11 sufrieron cambios significativos en la estabilidad, de los cuales 6 mostraron alteraciones a partir de las 4 horas tras su primer análisis. Los parámetros de recuento celular que peores características de estabilidad mostraron fueron los basófilos y los granulocitos inmaduros. Los parámetros de investigación que en mayor número de tiempos tras su llegada al laboratorio incumplieron los criterios de estabilidad fueron los relacionados con los neutrófilos y linfocitos; por el contrario, los parámetros de investigación de monocitos parecen mostrar mejores características de estabilidad.

En la tabla 3 están recogidos los parámetros que sufrieron cambios significativos y la hora a partir de la cual se producen. Asimismo, hemos calculado el factor de corrección a partir de la hora que podría aplicarse.

En el estudio de estabilidad de alarmas, de los 284 pacientes analizados, 217 no mostraron ninguna de las alarmas estudiadas desde la hora de llegada hasta las 12 horas siguientes. Esto significa que el 76% del total de pacientes analizados no tenían alarmas en ninguno de los tiempos de análisis, por lo que la muestra de estudio no parece ser muy heterogénea. El estudio estadístico no mostró diferencias significativas tiempo dependientes. Los resultados se muestran en la tabla 4.

2.2.2 Discusión

Las muestras han sido procesadas en las condiciones habituales del laboratorio core donde trabajamos, es decir, las muestras son analizadas y almacenadas a temperatura ambiente. Los recuentos de leucocitos (WBC) y de células totales nucleadas (TNC) mostraron buenas características de estabilidad en cualquiera de los tres canales. Puesto que la muestra de estudio es la misma, los resultados sugieren que cualquiera de los tres tipos de reactivos y métodos de medición se comporta de la misma manera en términos de estabilidad.

En general, puede observarse como los parámetros de recuento celular no se ven afectados por el paso del tiempo (≤ 12 horas), a excepción de los recuentos de menor proporción celular como son basófilos, granulocitos inmaduros y eosinófilos, en los que pequeños cambios de concentración originan gran dispersión de datos. Para conocer el comportamiento de estas células sería interesante que en otros estudios se incluyeran muestras con concentraciones altas en estos parámetros, para comprobar que siguen el mismo comportamiento de estabilidad. Sin embargo, la selección de muestras fue aleatoria, exceptuando la inspección inicial visual por la que descartamos la presencia de muestras lipémicas, ictéricas o hemolíticas. Además, tratamos de analizar muestras con recuentos en todo el rango de medición para la mayoría de parámetros convencionales.

De todos los parámetros de investigación que informan de la intensidad y amplitud de dispersión celular, puede observarse como los monocitos no muestran ninguna variación en la señal de dispersión, lo que significa que su morfología y contenido celular es estable incluso después de las 12 horas tras el primer análisis.

A diferencia de los monocitos, los parámetros de investigación de neutrófilos y linfocitos sí muestran cambios significativos tiempo dependientes. La intensidad de dispersión lateral (NE-SSC) y hacia adelante (NE-FSC) del área de los neutrófilos parecen ser de los parámetros que mayor variación sufren a partir de las 4h tras el primer análisis. NE-SSC es una medida de la granularidad, de manera que valores altos se corresponden con mayor granularidad y valores bajos con hipo-granularidad. La hiper-granularidad puede darse en procesos reactivos infecciosos o inflamatorios. Varios estudios han analizado la relación entre valores aumentados de NE-SSC y otros marcadores bioquímicos con el fin de predecir la sepsis (56-58), sobre todo si se trata de pacientes inmunocomprometidos en los que el número de leucocitos puede estar disminuido. Sin embargo, otros autores opinan que, a pesar de la neutrofilia, la producción de neutrófilos grandes, hipogranulares y rígidos conlleva a una reducción en la respuesta migratoria que desencadena el fracaso de la

respuesta inmunitaria y final instauración de la sepsis. Siguiendo esta línea Zonneveed et al. (59) concluyen la necesidad de crear un algoritmo diagnóstico junto con otros biomarcadores que permitan la identificación de neutrófilos con fenotipo hiperactivado de origen séptico que puedan diferenciarse de otros fenotipos de neutrófilos asociados a inflamación local u otras condiciones de reposo.

Por otro lado, la hipogranularidad de los neutrófilos es un signo de displasia que puede observarse en el Síndrome Mielodisplásico (SMD). Anteriores estudios han publicado la utilidad del parámetro NE-SSC a niveles bajos en combinación con la presencia de citopenias y/o monocitosis como criterio de revisión del frotis (12,60,61) con el fin de aumentar la detección de SMD o de Leucemia Mielomonocítica Crónica (LMMC). Si observamos el porcentaje medio del cambio ($\bar{X}_t\%$) en el parámetro NE-SSC de la tabla 2 del artículo original, $\bar{X}_t\%$ parece disminuir con el paso del tiempo, esto significa que la granularidad disminuye de forma significativa a partir de las 4 horas. Esto puede originar dos situaciones: a) Falsos negativos en pacientes que se utiliza el parámetro auxiliar NEUT-SSC para comprobar si se trata de un proceso activo infeccioso o inflamatorio; b) Falsos positivos en pacientes sanos que muestran una falsa hipogranularidad en los neutrófilos que en combinación con otras citopenias requerirá ser comprobado mediante un frotis. En el primer escenario, se pierde información que puede ser valiosa en el seguimiento de pacientes en unidades de cuidados críticos o postquirúrgicos, así como durante tratamientos quimioterápicos. En el segundo escenario, se generará un aumento de la revisión de frotis que sobrecarga el flujo de trabajo sin aportar valor añadido, y el consecuente consumo de recursos materiales y de personal.

Este estudio puede ser de utilidad para aquellos laboratorios que utilicen el parámetro NE-SSC como herramienta de apoyo al diagnóstico y en los que se trabaje con un impasse de tiempo entre extracción sanguínea y procesamiento de muestras. Para ello, proponemos añadir un factor corrector que multiplique la señal de dispersión del parámetro NEUT-SSC para todas aquellas muestras

que debido a la distancia entre el lugar de extracción y el laboratorio sufran un retraso en el análisis >4 horas. Este factor se puede incluir de manera automática en el software del analizador para todas aquellas muestras extraídas a cierta hora de la mañana y que no puedan analizarse antes de las 4 horas. Sin embargo, este factor no es útil cuando las muestras requieren un frotis de sangre para describir en detalle la morfología celular, ya que las buenas prácticas recomiendan que los frotis de sangre se realicen lo antes posible después de la extracción de sangre (34,62).

El parámetro de investigación NE-FSC también sufre cambios significativos a partir de las 6 horas tras su análisis inicial; concretamente, los resultados obtenidos sugieren que el paso del tiempo vuelve a los neutrófilos células más grandes. Si observamos la tabla 3, NE-FSC sufre un aumento de tamaño de 1.87%, aunque por el momento no sabemos si tiene relevancia clínica o si es de utilidad para algún otro estudio.

Nos ha sorprendido la estabilidad del parámetro NE-SFL, esto puede significar que la cantidad y tipo de orgánulos celulares y ácidos nucleicos son estables en el tiempo.

En la figura 1 puede observarse como los parámetros de investigación que informan de la morfología celular de los neutrófilos sufren cambios significativos mientras que el recuento permanece estable con el paso del tiempo.

En el caso de los linfocitos, el parámetro LY-Y, que también refleja la intensidad de fluorescencia de los ácidos nucleicos y organelas celulares, sufre cambios de estabilidad significativos a las 4 horas. La señal de intensidad decrece alrededor del 2%; esta variación podría observarse cualitativamente en el frotis, como previamente otros estudios han demostrado (40).

La especificidad de las alarmas leucocitarias (tabla 4) es muy alta debido al elevado número de muestras con alarmas negativas ($n = 217$), por lo que la muestra de estudio no es demasiado heterogénea. Aparentemente, la peor

sensibilidad aparece en la alarma de desviación izquierda de la serie granulocítica (Left shift). Sin embargo, no existe una tendencia clara a lo largo del tiempo. El análisis estadístico sugiere que no existen diferencias significativas dependientes del tiempo en la desaparición de alarmas de leucocitos. Los datos sugieren que las alarmas no se ven afectadas con el tiempo, aunque debido a la falta de alarmas positivas en la muestra de estudio, sería interesante confirmar este resultado en futuros estudios que evalúen muestras con mayor número de alarmas.

Las alarmas de tipo cualitativo de los autoanalizadores se programan en base a los resultados obtenidos en los parámetros de investigación, es decir, para avisar de la presencia de cierto tipo de células es necesaria la especificación de un punto de corte en el resultado de estos parámetros. A continuación, mediante algoritmos internos del equipo que analizan varios de estos parámetros simultáneamente, se emite definitivamente la alarma en cuestión.

Teóricamente, la alteración de la estabilidad observada en los parámetros de investigación debería seguir el mismo comportamiento en las alarmas. Sin embargo, observamos una discrepancia en la estabilidad entre parámetros de investigación y alarmas. Como se ha dicho anteriormente, las alarmas se generan en base al resultado obtenido en varios parámetros de investigación simultáneamente, por lo que deberían de manifestar en todos esos parámetros la alteración en la estabilidad. En nuestro estudio no hemos encontrado alteraciones en todos los parámetros de investigación, quizás sea esta la causa de la discrepancia. A pesar de ello, al no conocer el algoritmo interno por el que se generan las alarmas de estudio, no podemos explicar esta discrepancia.

2.2.3 Conclusiones

Para concluir, los parámetros de investigación de neutrófilos y linfocitos que informan sobre la morfología de las células sufren cambios significativos dependientes del tiempo. Estos cambios se pueden observar mediante la inspección visual del frotis de sangre periférica, pero hasta ahora no se había

realizado una evaluación cuantitativa mediante parámetros de investigación. Asimismo, se puede aplicar un factor multiplicador para corregir estas variaciones e incluirse en el Software del analizador.

3. TERCER ARTÍCULO

3.1 ARTÍCULO ORIGINAL

Science

Red Blood Cells and Platelets Conventional and Research Parameters: Stability Remarks Before Their Interpretation
A Method to Quantify and Correct Time-Dependent Changes

Irene Pérez, PhD,* Maria Elena Redín, MD

Laboratory Medicine 2020;XX:XX-XX

DOI: 10.1093/labmed/lmz083

ABSTRACT

Objectives: To analyze the stability of red blood cells, platelets, and reticulocytes of the research parameters, in combination with the respective conventional parameters, for each analyte; and to quantify the morphological changes in these analytes, to propose a correction factor for each.

Methods: Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) blood specimens from patients were reanalyzed in 2-hour intervals and then, the mean percentage (Xt%) changes were calculated. To evaluate the stability of the analyzed material, we used different criteria according to within-run and between-batch analytical variation, as well as intraindividual biological variation. Next, the mean deviation percentage of the

parameters that undergo time-dependent significant changes was calculated, to obtain a correction factor.

Results: Several conventional and research parameters showed significant alterations in the stability at an early time after arrival at the laboratory.

Conclusion: Cell variations over time can be quantified and corrected by applying a multiplying factor to the signal obtained in the analyzer.

Keywords: stability, research parameters, preanalytical error, Sysmex XN, cell population data, cell population data parameters

Abbreviations:

RBCs, red blood cells; RETs, reticulocytes; PLTs, platelets; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; ICISH, International Council for Standardization in Haematology; SLS, sodium lauryl sulfate; LFR, low-fluorescence reticulocytes; MFR, medium-fluorescence reticulocytes; HFR, high-fluorescence reticulocytes; IRF, immature reticulocyte fraction; IPF, immature platelet fraction; CV, coefficient of variance; CVb, between-batch precision; CVw, within-run precision; CVD, intraindividual precision; t0, laboratory arrival time; ASI, allowable stability interval; CI, confidence interval; CAP, College of American Pathologists; MSC, minimum significant change interval; DSC, desirable significant change interval; Di%, percentage of deviation; LISs, laboratory information systems; MCV, mean cell volume; micro-RBCs, microcytic RBCs; macro-RBCs, macrocytic RBCs; Hyper-Hb, hyperhemoglobinized RBCs; Hypo-Hb, hypohemoglobinized RBCs; RET-Hb, reticulocyte hemoglobin equivalent; FSC, forward scattered; SFL, side fluorescent light; RPI, reticulocyte production index; PLT-I, platelet count (impedance method); MPV, mean platelet volume; PCT, plateletcrit; P-LCR, platelet large-cell ratio; Hb, hemoglobin concentration; FRBCs, fragmented red blood cells

Department of Laboratory Medicine, Core Laboratory, University Hospital Donostia, Guipuzcoa, Spain

*To whom correspondence should be addressed.
irene.perez.casas@gmail.com

Research parameters of hematology analyzers, combined with reportable/diagnostic parameters, provide valuable diagnosis information. This information is evaluated internally in the laboratory to check results and complete the diagnosis findings.¹ For this reason, the results of the research parameters are not reported directly to clinicians, even if they could support the diagnosis and monitoring of certain diseases.

These parameters provide information regarding cell morphology and degree of immaturity; they are used in many cases by hematologists to predict the recovery of bone marrow after chemotherapy or bone-marrow transplant.² We note that, as of today, to our knowledge, there is no external quality-assessment scheme for these new parameters and therefore, those parameters can only be used to support diagnosis.

Also, there is little information in the literature regarding the stability of these parameters. It is common in many clinical

laboratories to have a time gap between venipuncture and specimen analysis. The situation is even worse when specimens are carried to centralized laboratories for analysis from hospitals that do not have the means to process those specimens.

Inappropriate stability conditions could lead to cell misclassification or incorrect interpretation if research parameters are used as a supporting monitoring tool. Thus, the aim of this study is to quantify time-dependent changes in the research parameters for red blood cells (RBCs), reticulocytes (RETs), and platelets (PLTs), in combination with their respective conventional parameters, to propose a method for calculation of a correction factor.

Materials and Methods

Blood Specimens

The study population comprises 274 patients: 10 blood specimens for performing within-run precision and 264 others for performing a stability study. All specimens were collected in spray-coated K₂EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) tubes (BD Vacutainer; Becton, Dickinson and Company) and stored at room temperature. Specimen analysis was performed between January 2017 and June 2017. The blood specimens were selected among those requested by physicians during their regular practice. All specimens were processed in the same analyzer and with the same technical personnel, to reduce variability. Before the analysis, we carried out a visual inspection, so that we could exclude lipemic or hemolyzed specimens, to avoid possible interference.

The selection criteria for performing the within-run precision were determined according to the guidelines of the International Council for Standardization in Haematology (ICSH)³: 3 specimens of patients with hematologic issues (namely, leukemia and altered leukocyte values), 2 specimens from patients with cancer (who had altered PLT values), 3 specimens from patients with anemia (hemoglobin, <70 g/L), and 2 specimens from patients whose parameters were within reference values.

To perform the stability study, each day, we randomly selected 3 blood specimens from the Emergency

Department (n = 118), and from the inpatient population (n = 146), for a total of 264 specimens. A requirement for specimen selection was that the specimens must have arrived to the laboratory within the first hour after blood collection. Because the precise time of blood collection was unknown, to properly reference the time-dependent changes over time, the set-point (t_{0H}) was considered to be the time at which the specimens arrived at the laboratory, and were analyzed for the first time. This study was approved by the Ethics Committees of the University Hospital Donostia-Osakidetza, in San Sebastián, Spain.

Principle of Measurement

In this study we used the hematological analyzer Sysmex XN (Sysmex Corporation). RBCs, RETs, and PLTs were analyzed using 3 methods: the sheath flow direct current detection method (impedance), through the RBC/PLT channel; the sodium lauryl sulfate (SLS)-hemoglobin method, involving application of SLS for measuring the hemoglobin concentration; and the flow cytometry method, used to count nucleated RBCs, reticulocytes, and PLTs.⁴

Special Channels and Parameters

RET Channel

Through the testing process, channel reticulocytes are classified as low-, medium-, and high-fluorescence reticulocytes (LFR, MFR, and HFR). The immaturity degree of reticulocytes is proportional to the nucleic-acid concentration and to the fluorescence signal (HFR > MFR > LFR). In other words, the stronger the signal we obtain, the higher the concentration of nucleic acids that the specimen has and the more immature the reticulocytes are. The parameter IRF (immature reticulocyte fraction) is an indicator of erythropoiesis that is useful to monitor the response of the bone marrow after chemotherapy and bone-marrow transplantation.⁵

PLT-F Channel

The main use of this channel is to perform an accurate count in thrombocytopenic specimens. The parameter IPF (immature platelet fraction) is useful in thrombocytopenic specimens to distinguish whether the origin of the thrombocytopenia is the bone marrow or the peripheral blood. Mature and immature platelets are separated according to

Table 1. Parameters and Definitions for Red Blood Cells, Reticulocytes, and Platelets

Parameter Abbreviation	Definition	Analysis Channel
RBC count	Red blood cell count (impedance method)	RBC/PLT
MCV	Mean corpuscular volume	
Micro-RBCs ^a	Microcytic red blood cells	
Macro-RBCs ^a	Macrocytic red blood cells	
PLT-I	Platelet count (impedance method)	
MPV	Mean platelet volume	
PCT	Plateletcrit	
P-LCR	Platelet large-cell ratio	
Hb	Hemoglobin concentration	HGB
RBC-O ^a	Red blood cell count (optical method)	RET
Hypo-Hb ^a	Percentage of hypohemoglobinized RBCs	
Hyper-Hb ^a	Percentage of hyperhemoglobinized RBCs	
FRBCs ^a	Fragmented RBCs	
RET	Reticulocyte (count)	
IRF	Immature reticulocyte fraction	
LFR	Low fluorescence ratio	
MFR	Medium fluorescence ratio	
HFR	High fluorescence ratio	
RET-He	Reticulocyte hemoglobin equivalent	
RET-Y ^a	Intensity of forward scattered light in the RET area of the RET scattergram	
RPI ^a	Reticulocyte production index	
PLT-O	Platelet count (optical method)	
PLT-F	Platelet count (fluorescence-labeled platelets)	PLT-F
IPF	Immature platelet fraction	

^aResearch parameter.

the RNA content. Immature platelets contain more RNA; thus, the fluorescence signal is higher than for the mature ones.⁶

Table 1 shows the parameter definitions and their respective analysis channels. Some parameters were measured in a smaller number of patients ($n < 264$), namely, RET ($n = 30$), fragmented RBCs (FRBCs; $n = 80$), Hypo-Hb ($n = 53$), and Hyper-Hb ($n = 96$). The other parameters were measured in 264 patients.

Statistical Analysis

Precision

The coefficient of variance (CV) represents the precision obtained with the following formula:

$$CV = \left(\frac{\text{Standard deviation}}{\text{Mean}} \right) * 100$$

Three different precision parameters were calculated according with different analytical variation criteria: between-batch precision (CVb), within-run precision (CVw), and intraindividual precision (CVD). During 1 month, we analyzed L2-XN CHECK quality-control material (Sysmex Corporation) twice and then calculated CVb. Simultaneously, blood specimens from 10 patients were selected based on the guidelines of the ICSH⁸ and reprocessed 10 times in a row, to quantify CVw. CVD data were obtained from the Desirable Biological Variation Database specifications.⁷

Stability Study

To evaluate the stability of each parameter, first, we calculated the mean percentage change ($\bar{X}_t\%$), represented by the formula $\bar{X}_t\% = (x_t/x_0) * 100$, where X_0 is the value obtained for the parameter at laboratory arrival time (t_0) and x_t is the parameter measured at different hours ($t_t = 2$ h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, and 12 h) after arrival. The analysis of specimens stored at room temperature represents the usual processing conditions in our core laboratory. For this reason, we omitted specimens stored at 4°C to 5°C from the analysis.

Then, we evaluated the stability of each parameter, comparing the $\bar{X}_t\%$ and the allowable stability interval (ASI). To calculate the ASI, we used the following general formula:

$$\begin{aligned} ASI &= [\bar{X}_{t_0}\% \pm z * CV] \\ \bar{X}_{t_0}\% &= 100 \\ z &= 1.65 \text{ or } 0.5 \end{aligned}$$

The factor 1.65 is derived from $Z = 1.65$, as determined by the 90% confidence interval (CI) value for bidirectional changes. According to College of American Pathologists (CAP) recommendations, the imprecision of a method should be less than or equal to one-half of the average within-subject variation (CVD), and this should be the goal for short-term laboratory imprecision (≤ 0.5 CVD).⁸

Taking into account the 3 different precision parameters obtained in the precision analysis, we calculated 3 kinds of ASI using the following criteria⁹:

- Interindividual metrology criteria:
 $ASI = MSC_b = [\bar{X}_{t_0}\% \pm 1.65 * CVb]$
- Intraindividual metrology criteria:
 $ASI = MSC_w = [\bar{X}_{t_0}\% \pm 1.65 * CVw]$
- Intraindividual biological variation:
 $ASI = DSC = [\bar{X}_{t_0}\% \pm 0.5 * CVD]$

MSC refers to the minimum significant change interval; DSC, the desirable significant change interval. Finally, we considered significant difference in the stability when the $\bar{X}_t\%$ exceeds any of the following 3 criteria: $\bar{X}_t\% > \text{MSC-b}$, $\bar{X}_t\% > \text{MSC-w}$, or $\bar{X}_t\% > \text{DSC}$.

Correction Factor

We propose a mathematical approach to calculate a correction factor that can be applied to parameters that undergo significant changes, according to the criteria described in the paragraph earlier herein. For the calculation of this factor, we need to obtain the percentage of deviation ($D_i\%$) of the parameter at different times, calculated as $D_i\% = ((\bar{X}_t\% - X_{t_0})/X_{t_0}) \times 100$. With those values, we then obtain the mean deviation [$\bar{D}_i\%$] between them, calculated as follows:

$\bar{D}_i\% = (\sum_{i=1}^n D_i(\%))/n$, where n is the number of times that the specimen has been analyzed since significant change has been observed. Finally, we obtain the correction factor as follows: Factor = $1 - (\bar{D}_i\%/100)$.

This multiplying factor could be used to correct the value of the signal in parameters that undergo alterations due to the time that has passed between collection and analysis, and could be included in the Sysmex XN software. To determine the extent to which the correction factor could be used, it would be necessary to take advantage of the recent improvements in laboratory information systems (LISs) that allow users to know the exact time of venipuncture and to perform a statistical study to set the SD values that guarantee the correctness of the factor. We recommend that each laboratory calculate its own correction factor from data collected in its usual laboratory conditions.

Results

In **Table 2** we show all the RBC, reticulocyte, and PLT parameters that we have studied. In this table we can observe the parameters mostly affected over time. Extended data of **Table 2** is available as Supplementary Data online. Research parameters that have been affected significantly due to elapsed time are shown in **Table 3**, together with the correction factors and their respective times from laboratory arrival.

RBCs and Reticulocytes

Thirteen of the 17 RBC parameters show significant changes in stability, and 8 of them display instability at an early time after laboratory arrival (≥ 4 hours). Parameters related to the absolute count of RBCs and reticulocytes do not show significant alterations in stability. Nevertheless, all the parameters related to cellular morphology (mean corpuscular volume [MCV], microcytic RBCs [micro-RBCs], macrocytic RBCs [macro-RBCs], and fragmented RBCs [FRBCs]), intracellular content (hypohemoglobinized [Hypo-Hb] and reticulocyte hemoglobin equivalent [RET-He]) and the degree of maturity of the reticulocytes (LFR, MFR, HFR, IRF, and RPI) expressed instability after the arrival of the specimens at the laboratory (**Table 2**).

Platelets

In the platelets series, 2 of the 7 parameters show significant changes in stability. The different methods of instrumentation (impedance, optic, and fluorescence) used to count the platelets do not show significant alterations in stability at any time. Nevertheless, the IPF parameter, which is related to platelet maturity, showed low stability from 2 hours after laboratory arrival of specimens.

Discussion

Research parameters are useful in some hematology conditions as an auxiliary tool. Some of those parameters express morphologic characteristics and some others express the degree of immaturity of the cells. RBC research parameters can inform health-care professionals about the shape, size, and hemoglobin content of those RBCs. These data could be helpful in the study of anemia and screening of the microangiopathy.

In reticulocytes, it is interesting to know the hemoglobin content and immaturity degree. Likewise, in PLTs, one can find parameters expressing size and degree of immaturity. In both types of cells, degree of immaturity is helpful in the study of bone marrow response and behaves as fast markers response. We believe this parameter is interesting because it can be quantitatively measured and monitored in several hematology pathologic manifestations. However, to use it correctly, it is necessary to know its stability conditions in advance, to avoid false conclusions regarding the clinical response of the patient.

Table 2. Stability Study of RBCs, RETs, and PLTs^a

Analyte	Precision			ASIs			Mean Percentage Change (\bar{X}_n %)					
	CVb	CVw	CVD	MSC_b	MSC_w	DSC	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
RBCs ($10^6/\mu\text{L}$)	0.8	0.8	1.6	98.7–101.3	98.6–101.4	99.2–100.8	99.9	99.9	99.9	99.9	100.0	100.2
RBC-O ($10^6/\mu\text{L}$)	1.6	0.9	1.6	97.2–102.8	98.5–101.5	99.2–100.8	100.1	100.2	100.6	100.6	100.8 ^z	101.2 ^z
MCV (fL)	0.7	0.1	0.7	98.7–101.3	99.8–100.2	99.7–100.4	100.8 ^z	101.7 ^{b,w,z}	102.5 ^{b,w,z}	103.4 ^{b,w,z}	104.4 ^{b,w,z}	105.2 ^{b,w,z}
Micro-RBCs (%)	10.5	7.3	NS	82.7–117.3	87.9–112.1	ND	96	90.5	84.3 ^w	79.5 ^{b,w}	74.3 ^{b,w}	69.9 ^{b,w}
Macro-RBCs (%)	1.8	2.7	NS	97–103	95.4–104.6	ND	103.7 ^b	108.0 ^{b,w}	113.3 ^{b,w}	119.4 ^{b,w}	128.7 ^{b,w}	135.5 ^{b,w}
Hb (g/L)	0.8	0.7	1.4	98.6–101.4	98.8–101.2	99.3–100.7	99.9	99.9	100.1	100.2	100.3	100.7 ^z
Hypo-Hb (%)	13.7	3.4	NS	77.4–122.6	94.3–105.7	ND	87.7 ^w	83.3 ^w	83.2 ^w	83.7 ^w	83.2 ^w	81.7 ^w
Hyper-Hb (%)	15.0	9.5	NS	75.2–124.8	84.3–115.7	ND	103.4	100.9	100	97.8	98.4	96.7
FRBCs (%)	30.3	13.0	NS	49.9–150.1	78.5–121.5	ND	78.7	70.9 ^w	67.0 ^w	66.4 ^w	64.3 ^w	66.6 ^w
RETs ($10^9/\text{L}$)	3.2	2.7	5.5	94.6–105.4	95.5–104.5	97.3–102.8	99.5	97.8	99.8	99	99.1	99.7
IRF (%)	10.3	3.4	NS	82.9–117.1	94.3–105.7	NS	101.9	103.6	105.7 ^w	106.1 ^w	108.0 ^w	107.2 ^w
LFR (%)	6.9	2.1	0.8	88.5–111.5	96.4–103.6	99.6–100.4	99.5 ^z	98.9 ^z	98.3 ^z	98.3 ^z	98.2 ^z	98.1 ^z
MFR (%)	9.6	5.0	6.5	84.1–115.9	91.7–108.3	96.8–103.3	101.6	103.4 ^z	105.0 ^z	105.8 ^z	106.9 ^z	105.4 ^z
HFR (%)	18.5	4.8	5.0	69.5–130.5	92–108	97.5–102.5	102.4	104.9 ^z	107.2 ^z	108.4 ^{w,z}	108.3 ^{w,z}	109.8 ^{w,z}
RET-He (pg)	1.1	0.6	NS	98.1–101.9	98.9–101.1	ND	100.3	100.1	99.7	99.3	99.1	98.9 ^w
RET-Y	0.8	0.4	NS	98.7–101.3	99.3–100.7	ND	100.2	100.1	99.9	99.6	99.5	99.4
RPI	4.8	3.5	NS	91.9–108.1	94.1–105.9	ND	101.4	102.1	105.9 ^w	107.8 ^w	110.7 ^{b,w}	113.1 ^{b,w}
PLT-I ($10^3/\mu\text{L}$)	3.0	1.7	4.55	94.9–105.1	97–103	97.7–102.3	99.8	99.5	99.7	99.6	99.5	99.3
PLT-O ($10^3/\mu\text{L}$)	5.5	2.2	4.55	90.9–109.1	96.4–103.6	97.7–102.3	99.9	99.5	99.3	99.7	99.9	100.2
PLT-F ($10^3/\mu\text{L}$)	5.0	0.9	4.55	91.7–108.3	98.5–101.5	97.7–102.3	99.5	100.1	99.5	99.8	100.2	99.5
MPV (fL)	1.4	1.0	2.15	97.6–102.4	98.2–101.8	98.9–101.1	100.6	100	99.8	99.3	99.1	98.8 ^z
PCT (%)	4.2	2.0	6	93–107	96.6–103.4	97–103	100.3	99.7	99.5	98.9	98.5	98.4
P-LCR (%)	5.7	3.5	NS	90.5–109.5	94.1–105.9	ND	101.8	100.4	99.3	98.2	97.3	96.6
IPF (%)	3.2	2.5	NS	94.6–105.4	95.8–104.2	ND	106.2 ^{b,w}	108.6 ^{b,w}	108.4 ^{b,w}	110.3 ^{b,w}	109.3 ^{b,w}	111.4 ^b

RBC, red blood cell; RETs, reticulocytes; PLTs, platelets; ASIs, allowable stability intervals; CVb, between-batch precision; CVw, within-run precision; CVD, desirable biological variation specifications; MSC-b, minimum significant change based on between-batch analytical variation; MSC-w, minimum significant change within-run analytical variation; DSC, desirable significant change; RBC-O, red blood cell count (optical method); z, exceed biological criteria based on intraindividual biological variation; b, exceed metrological criteria based on between-batch analytical variation; w, exceed metrological criteria based on within-run analytical variation; MCV, mean corpuscular volume; micro-RBCs, micro-red blood cells; ND, not determined; NS, not specified in any data source; macro-RBCs, macro-red blood cells; Hb, hemoglobin; Hypo-Hb, hypohemoglobinized; Hyper-Hb, hyperhemoglobinized; FRBCs, fragmented red blood cells; IRF, immature reticulocyte fraction; LFR, low fluorescence ratio; MFR, medium fluorescence ratio; HFR, high fluorescence ratio; RET-He, reticulocyte hemoglobin equivalent; RET-Y, intensity of forward scattered light in the reticulocyte area of the reticulocyte scattergram; RPI, reticulocyte production index; PLT-I, platelet count (impedance method); PLT-O, platelet count (optical method); PLT-F, platelet count (fluorescence-labeled platelets); MPV, mean platelet volume; PCT, plateletcrit; P-LCR, platelet large-cell ratio; IPF, immature platelet fraction.

^aTested on the Sysmex XN analyser (Sysmex Corporation).

RBCs

The RBC count performed by the impedance measurement device shows stronger stability characteristics than the optic method (through the reticulocyte channel).

The findings of several studies^{10–12} agree with the low stability observed in the classic parameters of the erythrocytes, related to the size. The changes in the erythrocytes due to the delay in analysis also can be observed in the research parameters, which inform researchers specifically regarding morphologic characteristics and intracellular content. In this case, micro-RBC and macro-RBC, both of which are research parameters, show low stability after 4 hours following laboratory arrival. Nevertheless, their behavior is antagonistic: as can be observed in Figure 1, it seems

that the percentage of macro-RBC increases over time, whereas the percentage of micro-RBC decreases. This situation can cause a misclassification of RBC microcytosis as normocytosis and of normocytosis as macrocytosis.¹³

FRBCs is a research parameter used in screening for microangiopathic manifestations. The quantification of FRBCs also has been proposed for monitoring stem-cell and bone-marrow transplants.^{14–16} It is analyzed through the RET channel and is represented below the RBC area in the RET scattergram. The forward scattered (FSC) signal is stronger for larger cells, and the intensity of the side fluorescent light (SFL) reflects the type and amount of nucleic acids. FRBCs are identified based on size and hemoglobin content but are independent of the shape of the RBCs.¹⁷ FRBCs are localized on this specific area due to FSC and SFL signals. The

Table 3. Parameters with Significant Changes from the Initial Analysis and Their Respective Multiplier Factor^a

Analyte	Mean (SD) %	Factor	Time
RBC-O (106/ μ L)	1.00 (0.28)	0.990	≥ 10 h
MCV (fL)	3.00 (1.66)	0.970	≥ 2 h
Micro-RBCs (%)	-23.00 (6.25)	1230	≥ 6 h
Macro-RBCs (%)	18.10 (12.24)	0.819	≥ 2 h
Hypo-Hb (%)	-16.20 (2.03)	1162	≥ 2 h
FRBCs (%)	-33.68 (3.69)	1337	≥ 4 h
IRF (%)	6.75 (1.05)	0.933	≥ 6 h
LFR (%)	-1.45 (0.54)	1015	≥ 2 h
MFR (%)	5.30 (1.28)	0.947	≥ 4 h
HFR (%)	7.72 (1.83)	0.923	≥ 4 h
RPI	9.38 (3.17)	0.906	≥ 6 h
MPV (fL)	-1.20 (0)	1012	≥ 12 h
IPF (%)	9.03 (1.78)	0.910	≥ 2 h

RBC-O, red blood cell count (optical method); MCV, mean cell volume; micro-RBCs, microcytic red blood cells; macro-RBCs, macrocytic red blood cells; Hypo-Hb, hypohemoglobinized; FRBCs, fragmented red blood cells; IRF, immature reticulocyte fraction; LFR, low fluorescence ratio; MFR, medium fluorescence ratio; HFR, high fluorescence ratio; RPI, reticulocyte production index; MPV, mean platelet volume; IPF, immature platelet fraction.

^aThe correction factor counteracts the deviation due to overtime. Time: expression of the hour from which it is necessary to apply the factor.

FSC is lower than that of intact RBC, and SFL is extremely low due to the absence of nucleic acids in RBC.

Figure 1 shows how the the percentage of FRBCs decreases significantly over time. This behavior may occur due to the interaction of the anticoagulant and cell membranes over time. Anticoagulant alters the cell-membrane properties and generates aggregation processes that are identified in the analyzer as large platelets or as small RBCs.¹⁷

The hypohemoglobinized RBCs (Hypo-Hb %) research parameter represents the percentage of RBC with cellular hemoglobin content lower than 17 pg. It is an early marker for the diagnosis of iron deficiency before the onset of anemia¹⁸⁻²⁰ and is obtained from the RBC-He parameter. The RBC-He value is comparable to the mean corpuscular hemoglobin (MCH) value. In contrast with the findings of other studies,²¹ in our results, Hypo-Hb% decreases significantly over time. We cannot conclude a specific behavior, this parameter is not recommended by the National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF-KDOQI) guidelines because it presents low stability at room temperature and has different behaviors depending on the analyzer used.^{22,23} Further, when we tested the Hyper-Hb % parameter, our specimens only yielded results in the lower range of the data.

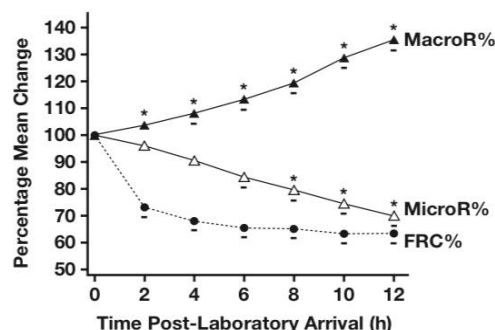


Figure 1

Research parameter that express cellular morphology. MacroR%: macrocytic red blood cell; microR%: microcytic red blood cell; FRC%: fragmented red blood cells. Symbols around the points – and * exceeds metrological criteria based on within-run and between-batch analytical variation respectively.

Reticulocytes

Reticulocyte fluorescence signal is proportional to RNA content, and RNA content is proportional to cell immaturity. Parameters that report the fluorescence of the reticulocytes (LFR < MFR < HFR) show different and contradictory behaviors. For example, LFR seems to decrease over time, whereas MFR and HFR increase. The magnitude of the change in \bar{X}_0 % is bigger in HFR than in LFR. This trend suggests that the most immature reticulocytes (HFR) have higher probability of yielding a false increase. In accordance with this approach, Lippi et al¹³ found the same behavior in reticulocytes, but those researchers concluded that the substantial increase in the HFR observed after 24 hours in storage is consistent with an artificially high estimate as a result of interference, likely arising from aged leukocytes or PLTs. However, the conditions of the study and the time of analysis of our investigation are not the same.

Immature reticulocyte fraction (IRF) parameter is an early and sensitive index of erythropoiesis. The utility of this parameter together with the reticulocyte production index (RPI) parameter has been proven in several studies²⁴⁻²⁸ to evaluate bone-marrow recovery after chemotherapy or bone-marrow transplants. In fact, an increase in the IRF predicts the success of the transplant before the increase in absolute neutrophil and total reticulocyte counts can be obtained.^{29,30} As shown in **Table 2**, IRF and RPI show significant stability changes after 4 hours from the initial time

of analysis. As shown in **Figure 2**, both parameters seem to increase their value over time. This phenomenon could generate false-recovery results from the bone marrow if the blood specimen is not analyzed promptly.

PLTs

PLT count shows strong stability characteristics in every time-post analysis and in the 3 channels. Because the study specimen is the same, the results suggest that any of the 3 kinds of reagents and analysis channels behave the same ways, in terms of stability. The findings of another study³¹ reveal similar results as late as the first 6 hours after collection at room temperature.

In the same way as reticulocytes, immature PLTs can be quantified by measuring their fluorescence. The fluorescence is proportional to the RNA content; the RNA content is higher in immature PLTs in contrast with mature PLTs. The number of immature PLTs is a reflection of thrombopoiesis. An increase in IPF can provide an early information of PLT destruction in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura or immune thrombocytopenia.³² In the same way, it could be an early indicator in the recovery of bone marrow after chemotherapy or bone-marrow transplant.^{33–35} In these patients, the prediction of thrombopoiesis regeneration could reduce prophylactic platelet transfusion.^{36–38} The IPF parameter is the only one that underwent significant changes in stability 2 hours or more after laboratory arrival. Our results suggest that IPF increases over time (**Figure 2**) and may give false results of thrombopoiesis recovery, as observed in the findings from other studies, which used a 4°C storage temperature.^{39,40}

Table 3 shows the factors and the time from which they can be applied. To validate the correction factors, we have performed a post-analysis review, applying the factors to the original specimens at different times, to check whether the results given are closer to the original values than the measured values at those times. In our series of data, we have observed that the SD of the mean deviation percentage has an influence on the validity of the mathematical approximation. For those parameters showing a SD of less than 7, the model has proven to yield a more-accurate result than the measured value, whereas for those parameters showing higher dispersion, the factor may yield a worse result than the value given by the analyzer at the time of measurement. Also, the precise time of the collection in this study is unknown. Thus, the calculation of the correction factor suggested herein should be

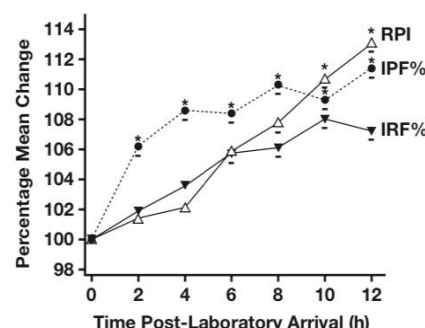


Figure 2

Research parameter that express cellular maturity. Symbols around the points – and * exceeds metrological criteria based on within-run and between-batch analytical variation respectively. IPF%, immature platelet fraction; IRF%, immature reticulocyte fraction; RPI, reticulocyte production index.

understood as a methodological approach to be studied in further detail so that it may be applied systematically.

The parameters of RBCs, reticulocytes and PLTs that inform researchers regarding the morphologic characteristics and immaturity of cells experience significant time-dependent changes. These parameters are used to evaluate the bone marrow response in chemotherapy treatments and bone marrow transplants. In our center, these blood specimens from these patients usually are analyzed before 1 hour after venipuncture because they are in the same hospital where the specimens are collected. So in our case, for these parameters, it is not necessary to estimate a correction factor. Nevertheless, it is still important and necessary to know the stability conditions to apply these parameters in centers where specimens are not processed immediately.

To conclude, it is not recommended to use parameters that report immaturity or morphologic characteristics of cells to study the response to bone-marrow transplantation, after chemotherapy treatment or immune thrombocytopenic purpura treatment, if the blood specimens are not analyzed immediately. In such cases, a correction factor should be applied. **LM**

Supplementary Data

Supplemental figures and tables can be found in the online version of this article at www.labmedicine.com

References

1. Sysmex Europe GmbH. Research parameter(s). <https://www.sysmex-europe.com/academy/library/glossary/research-parameter-s-12.html>. Accessed October 30, 2019.
2. Morkis IVC, Farias MG, Rigoni LDC, et al. Assessment of immature platelet fraction and immature reticulocyte fraction as predictors of engraftment after hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Lab Hematol*. 2015;37(2):259–264.
3. Briggs C, Culp N, Davis B, d'Onofrio G, Zini G, Machin SJ. ICSH guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting. *Int J Lab Hematol*. 2014;36(6):613–627.
4. Sysmex Europe GmbH. Fluorescence flow cytometry. <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/measurement-technologies/fluorescence-flow-cytometry.html>. Accessed October 30, 2019.
5. Sysmex Europe GmbH. RET Channel. <https://www.sysmex-europe.com/academy/clinic-laboratory/analyser-channels/ret-channel.html>. Accessed October 20, 2019.
6. Sysmex Europe GmbH. PLT-F Channel. <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/measurement-technologies/plt-f-channel.html>. Accessed October 20, 2019.
7. Minchinela J, Ricós C, Perich C, Fernández-Calle P, Alvarez V, Domenech M. Biological variation database, and quality specifications for imprecision, bias and total error (desirable and minimum). The 2014 update. <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>. Accessed October 30, 2019.
8. Ricós C, Álvarez V, Minchinela J, et al. Biologic variation approach to daily laboratory. *Clin Lab Med*. 2017;37(1):47–56.
9. Oddo C, Lombard E, Portugal H. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. *Clin Biochem*. 2012;45(6):464–469.
10. Gulati GL, Hyland LJ, Kocher W, Schwarting R. Changes in automated complete blood cell count and differential leukocyte count results induced by storage of blood at room temperature. *Arch Pathol Lab Med*. 2002;126(3):336–342.
11. Wood BL, Andrews J, Miller S, Sabath DE. Refrigerated storage improves the stability of the complete blood cell count and automated differential. *Am J Clin Pathol*. 1999;112(5):687–695.
12. Tatsumi N, Miwa S, Lewis SM; International Society of Hematology, and the International Council for Standardization in Haematology. Specimen collection, storage, and transmission to the laboratory for hematological tests. *Int J Hematol*. 2002;75(3):261–268.
13. Lippi G, Salvagno GL, Solero GP, Franchini M, Guidi GC. Stability of blood cell counts, hematologic parameters and reticulocytes indexes on the Advia A120 hematology analyzer. *J Lab Clin Med*. 2005;146(6):333–340.
14. Ruutu T, Barosi G, Benjamin RJ, et al; European Group for Blood and Marrow Transplantation; European LeukemiaNet. Diagnostic criteria for hematopoietic stem cell transplant-associated microangiopathy: results of a consensus process by an International Working Group. *Haematologica*. 2007;92(1):95–100.
15. Jodele S, Laskin BL, Dandoy CE, et al. A new paradigm: Diagnosis and management of HSCT-associated thrombotic microangiopathy as multi-system endothelial injury. *Blood Rev*. 2015;29(3):191–204.
16. Jodele S, Dandoy CE, Myers KC, et al. New approaches in the diagnosis, pathophysiology, and treatment of pediatric hematopoietic stem cell transplantation-associated thrombotic microangiopathy. *Transfus Apher Sci*. 2016;54(2):181–190.
17. Buttarello M, Plebani M. Automated blood cell counts: state of the art. *Am J Clin Pathol*. 2008;130(1):104–116.
18. Urrechaga E, Borque L, Escanero JF. Erythrocyte and reticulocyte indices in the assessment of erythropoiesis activity and iron availability. *Int J Lab Hematol*. 2013;35(2):144–149.
19. Urrechaga E, Boveda O, Aguayo FJ, et al. Percentage of hypochromic erythrocytes and reticulocyte hemoglobin equivalent predictors of response to intravenous iron in hemodialysis patients. *Int J Lab Hematol*. 2016;38(4):360–365.
20. Buttarello M, Pajola R, Novello E, Mezzapelle G, Plebani M. Evaluation of the hypochromic erythrocyte and reticulocyte hemoglobin content provided by the Sysmex XE-5000 analyzer in diagnosis of iron deficiency erythropoiesis. *Clin Chem Lab Med*. 2016;54(12):1939–1945.
21. Emmens AA, Hoffmann JJ, Krockenberger M, Van Wijk EM. New erythrocyte and reticulocyte parameters on CELL-DYN Sapphire: analytical and preanalytical aspects. *Int J Lab Hematol*. 2012;34(3):274–282.
22. Archer NM, Brugnara C. Diagnosis of iron-deficient states. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2015;52(5):256–272.
23. Buttarello M, Pajola R, Novello E, et al. Diagnosis of iron deficiency in patients undergoing hemodialysis. *Am J Clin Pathol*. 2010;133(6):949–954.
24. Greinix HT, Linkesch W, Keil F, et al. Early detection of hematopoietic engraftment after bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation by highly fluorescent reticulocyte counts. *Bone Marrow Transplant*. 1994;14(2):307–313.
25. Lesesve JF, Lacombe F, Marit G, Bernard P, Belloc F, Reiffers J. High fluorescence reticulocytes are an indicator of bone marrow recovery after chemotherapy. *Eur J Haematol*. 1995;54(1):61–63.
26. Kanold J, Bezou MJ, Coulet M, et al. Evaluation of erythropoietic/hematopoietic reconstitution after BMT by highly fluorescent reticulocyte counts compares favorably with traditional peripheral blood cell counting. *Bone Marrow Transplant*. 1993;11(4):313–318.
27. Kuse R. The appearance of reticulocytes with medium or high RNA content is a sensitive indicator of beginning granulocyte recovery after aplastic cytostatic drug therapy in patients with AML. *Ann Hematol*. 1993;66(4):213–214.
28. Kuse R, Foures C, Jou JM, d'Onofrio G, Paterakis G. Automated reticulocyte counting for monitoring patients on chemotherapy for acute leukaemias and malignant lymphomas. *Clin Lab Haematol*. 1996;18 Suppl 1:39–43.
29. Torres A, Sanchez J, Lakomsky D, et al. Assessment of hematologic progenitor engraftment by complete reticulocyte maturation parameters after autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2001;86(1):24–29.
30. Noronha JFA, De Souza CA, Vigorito AC, et al. Immature reticulocytes as an early predictor of engraftment in autologous and allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Lab Haematol*. 2003;25(1):47–54.
31. Daves M, Zagler EM, Cemin R, et al. Sample stability for complete blood cell count using the Sysmex XN haematological analyser. *Blood Transfus*. 2015;13(4):576–582.
32. Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol*. 2004;126(1):93–99.
33. Abe Y, Wada H, Tomatsu H, et al. A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF). *Thromb Res*. 2006;118(4):463–469.
34. Macchi I, Chamlian V, Sadoun A, et al. Comparison of reticulated platelet count and mean platelet volume determination in the evaluation of bone marrow recovery after aplastic chemotherapy. *Eur J Haematol*. 2002;69(3):152–157.
35. Stohlwetz P, Stiegler G, Knöbl P, Höcker P, Panzer S. The rise of reticulated platelets after intensive chemotherapy for AML reduces the need for platelet transfusions. *Ann Hematol*. 1999;78(6):271–273.
36. Chaoui D, Chakroun T, Robert F, et al. Reticulated platelets: a reliable measure to reduce prophylactic platelet transfusions after intensive chemotherapy. *Transfusion*. 2005;45(5):766–772.
37. Briggs C, Hart D, Kunka S, Oguni S, Machin SJ. Immature platelet fraction measurement: a future guide to platelet transfusion requirement

- after haematopoietic stem cell transplantation. *Transfus Med.* 2006;16(2):101–109.
38. Takami A, Shibayama M, Orito M, et al. Immature platelet fraction for prediction of platelet engraftment after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2007;39(8):501–507.
39. Osei-Bimpong A. The effect of storage on the clinical utility of the immature platelet fraction. *Hematology.* 2009;14(2):118–121.
40. Osei-Bimpong A, Saleh M, Sola-Visner M, Widness J, Veng-Pedersen P. Correction for effect of cold storage on immature platelet fraction. *J Clin Lab Anal.* 2010;24(6):431–433.

3.2 ANÁLISIS DEL ARTÍCULO EN CASTELLANO

3.2.1 Resultados

En la tabla 2 del artículo original se muestran los parámetros de hematíes, reticulocitos y plaquetas estudiadas. En esta tabla podemos observar los parámetros más afectados a lo largo del tiempo.

Los parámetros de investigación afectados significativamente por el tiempo se recogen en la tabla 3, junto con el factor de corrección y la hora a partir de la cual se encuentra alterado.

De los 17 parámetros de estudio de la serie roja, 13 sufrieron cambios significativos en la estabilidad, de los cuales 8 lo hicieron incluso a las 4 horas tras su análisis inicial. Los parámetros relacionados con el recuento absoluto de hematíes y reticulocitos no parecen mostrar alteraciones de la estabilidad significativas en ninguna de las horas de estudio. Sin embargo, todos aquellos parámetros relacionados con la morfología (MCV, Micro-RBC, Macro-RBC, FRC), contenido celular (Hypo-He y RET-He) y grado de madurez en reticulocitos (LFR, MFR, HFR, RFI y RPI) muestran baja estabilidad tras su análisis inicial (tabla 2).

De los 7 parámetros de estudio de la serie plaquetar, 2 sufrieron cambios significativos en la estabilidad. Los parámetros relacionados con el recuento de plaquetas, en cualquiera de los tres métodos de recuento celular (Impedancia, Óptica y Fluorescencia) no parecen mostrar alteraciones de la estabilidad significativas en ninguna de las horas de estudio. Sin embargo, el parámetro IPF, relacionado con la inmadurez plaquetar, muestra baja estabilidad a partir de las 2 horas.

3.2.2 Discusión

Los parámetros de investigación de los eritrocitos pueden informar sobre su forma, tamaño y contenido de hemoglobina. Estos datos podrían ser útiles en el screening de anemias y detección de microangiopatías.

Además de los parámetros convencionales de recuento celular, en los reticulocitos es interesante conocer el contenido de hemoglobina y su grado de inmadurez; en el caso de las plaquetas, el tamaño y grado de inmadurez. En ambas células, el grado de inmadurez es útil en el estudio de la respuesta de la médula ósea y se comporta como un marcador de respuesta rápida. Este parámetro es interesante porque se puede medir y monitorear cuantitativamente en varias patologías hematológicas. No obstante, para utilizarlo correctamente es necesario conocer sus condiciones de estabilidad para evitar conclusiones falsas sobre la respuesta clínica del paciente.

Hematíes

El recuento de hematíes realizado por impedancia muestra mejores características de estabilidad que el método óptico (a través del canal de reticulocitos).

Varios estudios coinciden con la baja estabilidad observada en los parámetros clásicos de los eritrocitos relacionados con el tamaño (32,63,64). Los cambios en los eritrocitos debido al retraso en el análisis se pueden observar también en los parámetros de investigación que informan específicamente sobre la morfología y el contenido intracelular. En este caso, Micro-RBC y Macro-RBC, ambos parámetros de investigación, muestran baja estabilidad después de 4 horas posteriores a la llegada al laboratorio. Sin embargo, como puede observarse en la figura 1, su comportamiento es antagónico; parece que el porcentaje de Macro-RBC aumenta con el tiempo mientras que el porcentaje de Micro-RBC disminuye. Esta situación puede causar una clasificación errónea

de hematíes microcíticos como normocíticos, así como de hematíes normocíticos como macrocíticos (64).

El parámetro de investigación que mide la presencia de eritrocitos fragmentados (FRC) es útil en el cribado de PTT, CID y microangiopatías. También se ha propuesto la monitorización de FRC para el seguimiento del trasplante de células madre y médula ósea (65-67). Se analiza a través del canal RET y se representa debajo del área de RBC en el diagrama de dispersión RET. Como se ha mencionado anteriormente, la señal FSC es más fuerte para las células más grandes y la intensidad de la luz fluorescente lateral (SFL) refleja el tipo y la cantidad de ácidos nucleicos. FRC se identifica en función del tamaño y el contenido de hemoglobina, pero es independiente de la forma y tamaño de los hematíes (68). Los FRC están localizados en esta área específica debido a la señal FSC y SFL. El FSC es menor que el de los hematíes intactos y el SFL es extremadamente bajo debido a la ausencia de ácidos nucleicos en los hematíes. En la figura 1 se puede observar cómo el porcentaje de FRC disminuye significativamente con el tiempo. Este comportamiento puede deberse a la interacción del anticoagulante y las membranas celulares a lo largo del tiempo. El anticoagulante altera las propiedades de la membrana celular y genera procesos de agregación que se identifican en el analizador como plaquetas grandes o como hematíes pequeños (68).

El parámetro HYPO-He% representa el porcentaje de hematíes con un contenido de hemoglobina celular inferior a 17 pg, es decir, el porcentaje de hematíes hipohemoglobinizados. Es un marcador temprano para el diagnóstico de deficiencia de hierro antes del inicio de la anemia (69-71). Se obtiene del parámetro RBC-He, el cual es comparable al valor de hemoglobina corpuscular media (MCH). Contrastando nuestros resultados con otros estudios (72), hipo-He% disminuye significativamente con el tiempo. No podemos concluir un comportamiento específico ya que este parámetro no es recomendado por las guías KDOQI, porque presenta baja estabilidad a temperatura ambiente y tiene comportamientos diferentes según el analizador utilizado (73,74). Con respecto

al parámetro Hyper-He% solo obtuvimos muestras con resultados en el rango de datos más bajo.

Reticulocitos

La señal de fluorescencia de los reticulocitos es proporcional al contenido de ARN; el contenido de ARN es proporcional a la inmadurez celular. Los parámetros que informan de la fluorescencia de los reticulocitos (LFR <MFR <HFR) muestran un comportamiento diferente y contradictorio. Por ejemplo, LFR parece disminuir con el tiempo, mientras que MFR y HFR aumentan. La magnitud del cambio en $\overline{X}_{ti}\%$ es mayor en HFR que en LFR. Esta tendencia sugiere que los reticulocitos más inmaduros (HFR) tienen mayor probabilidad de experimentar un falso aumento. De acuerdo con este enfoque, Lippi et al. (64) encontraron el mismo comportamiento en los reticulocitos, pero concluyeron que el aumento observado en HFR después de 24 horas de almacenamiento puede ser debida a una interferencia, que consiste en una estimación al alza, probablemente derivada de leucocitos envejecidos o plaquetas. Sin embargo, las condiciones del estudio y los tiempos de análisis de nuestra investigación no son los mismos.

El parámetro de la fracción de reticulocitos inmaduros (IRF) es un marcador de respuesta rápida y sensible de eritropoyesis; su utilidad junto con el parámetro del índice de producción de reticulocitos (RPI) ha sido probada en varios estudios para evaluar la recuperación de la médula ósea después de quimioterapia o trasplantes de médula ósea (25,75-78). De hecho, un aumento en el IRF predice el éxito del trasplante antes de que se pueda obtener el aumento en los recuentos absolutos de neutrófilos y reticulocitos totales (79,80). Si observamos la tabla 2, IRF y RPI sufren cambios de estabilidad significativos después de 4 horas desde el momento inicial de análisis. Como se muestra en la figura 2, ambos parámetros parecen aumentar con el tiempo. Esto podría generar falsos resultados de recuperación en médula ósea si la muestra de sangre no se analiza con prontitud.

Plaquetas

El recuento de plaquetas muestra buenas características de estabilidad en cada tiempo de análisis y en los tres canales de análisis. Como la muestra del estudio es la misma, los resultados sugieren que cualquiera de los tres tipos de reactivos y canales de análisis se comporta igual en términos de estabilidad. Otro estudio revela resultados similares hasta las primeras 6 horas posteriores a la extracción a temperatura ambiente (81).

Al igual que los reticulocitos, las plaquetas inmaduras pueden cuantificarse midiendo su fluorescencia. La fluorescencia es proporcional al contenido de ARN, y el contenido de ARN es mayor en las plaquetas inmaduras en contraste con las plaquetas maduras. El número de plaquetas inmaduras es un reflejo de la trombopoyesis. Un aumento del índice de plaquetas inmaduras (IPF) puede proporcionar una información de manera temprana de la destrucción plaquetaria en pacientes con púrpura trombocitopénica trombótica o púrpura trombocitopénica inmunitaria (82). Asimismo, podría ser un indicador temprano en la recuperación de médula tras un tratamiento quimioterápico o trasplante de médula (83-85). En estos pacientes, la predicción de la recuperación de la trombopoyesis podría reducir la transfusión profiláctica de plaquetas (86-88). El parámetro IPF es el único que sufrió cambios significativos en la estabilidad ≥ 2 horas tras su llegada al laboratorio. Nuestros resultados sugieren que IPF aumenta con el tiempo (figura 2) y puede dar resultados falsos de recuperación de la trombopoyesis, como se observó en otros estudios que utilizaron una temperatura de almacenamiento de 4° C (89,90).

La Tabla 3 muestra los factores de corrección junto con el tiempo a partir del cual se pueden aplicar. Para validar los factores de corrección hemos realizado un post-análisis aplicando los factores sobre las muestras originales en diferentes tiempos para comprobar que los resultados dados se acercan más a los valores originales que a los valores medidos en esos mismos tiempos. En nuestra serie de datos, hemos observado que la desviación estándar (DE) del

porcentaje medio del cambio influye en la validez de la aproximación matemática. Para aquellos parámetros que muestran una DE <7, el modelo ha demostrado dar un resultado más preciso que el valor medido en tiempos posteriores al de inicio de análisis, mientras que para aquellos que muestran una mayor dispersión, el factor puede dar un resultado peor que el valor dado por el analizador en el momento de la medición. Un inconveniente de este estudio es que se desconoce el momento exacto de extracción de la muestra, si bien fueron analizados dentro de la primera hora tras la venopunción, por lo que el cálculo del factor de corrección aquí sugerido debe entenderse como un enfoque metodológico a ser estudiado en mayor detalle si la intención es la de aplicarse de manera sistemática.

En resumen, los parámetros de hematíes, reticulocitos y plaquetas que informan sobre la morfología e inmadurez de las células sufren cambios significativos dependientes del tiempo. Estos parámetros se utilizan para evaluar la respuesta de la médula ósea en tratamientos de quimioterapia y trasplantes de médula. En nuestro centro, las muestras de sangre de estos pacientes suelen ser analizadas antes de 1 hora tras la punción venosa, ya que se encuentran en el mismo hospital donde se extrae la muestra. Por lo tanto, en nuestra práctica clínica, no es necesario estimar un factor de corrección para estos parámetros. Sin embargo, sigue siendo importante y necesario conocer las condiciones de estabilidad para aplicar estos parámetros en centros donde las muestras no se procesan de forma inmediata.

3.2.3 Conclusiones

Para concluir, no se recomienda utilizar parámetros que informen sobre la inmadurez o morfología de las células si las muestras de sangre no se analizan de inmediato, sobre todo si la intención es evaluar la respuesta al trasplante de médula ósea, o monitorizar el tratamiento de quimioterapia y de la PTI. En este caso, podría aplicarse un factor de corrección.

CONCLUSIONES

IX. CONCLUSIONES

1. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS

1.1 PRIMER ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Mediante esta publicación se concluye:

- La imprecisión interserial del analizador Sysmex XN 2000 cumple con las especificaciones de la variabilidad biológica.
- Tras realizar el estudio de comparación de métodos entre los analizadores Sysmex XE-5000 y Sysmex XN-2000 se encontraron diferencias significativas en algunos parámetros. Sin embargo, estas diferencias fueron superiores a las especificaciones de la variabilidad biológica sólo en el caso de los neutrófilos y basófilos. Por lo general, estas diferencias son de signo positivo para el nuevo analizador XN-2000, lo que significa que realiza recuentos más sensibles. Asimismo, consideramos que estas diferencias no suponen un cambio importante entre dos mediciones consecutivas, es decir, basándonos en la evolución clínica del paciente, son cambios que no presentan relevancia clínica.
- De manera global, encontramos mejores tasas de especificidad para las alarmas estudiadas en el analizador XN-2000, lo que se traduce en una mejora del flujo de trabajo.

1.2 SEGUNDO ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Mediante esta publicación se concluye:

- A excepción de los eosinófilos, basófilos y granulocitos, el resto de parámetros convencionales de la serie leucocitaria mostraron buenas características de estabilidad.
- Varios parámetros de investigación de los neutrófilos y linfocitos que informan de la morfología celular sufren cambios significativos dependientes del tiempo con respecto a la estabilidad.

- El estudio de estabilidad de alarmas de la serie leucocitaria no mostró diferencias significativas por el retraso en el análisis de las muestras. No obstante, la falta de alarmas positivas en la muestra de estudio no permite concluir que las alarmas sean estables en el tiempo.
- Las muestras que no presentaron alarmas de leucocitos en un análisis inicial no dieron nuevas alarmas de leucocitos en las siguientes horas de estudio, lo que significa que el retraso en el análisis no genera nuevas extensiones a revisar según nuestra muestra de estudio.
- A pesar de encontrar alteraciones en la estabilidad de los parámetros de investigación, no hemos encontrado este mismo comportamiento en las alarmas cualitativas de tipo leucocitario estudiadas en la misma muestra de estudio.

1.3 TERCER ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Mediante esta publicación se concluye:

- Los parámetros convencionales mostraron ser estables en el tiempo a excepción del volumen corpuscular medio, la fracción de reticulocitos inmaduros y fracción de plaquetas inmaduras.
- Los parámetros de investigación que informan de la morfología de eritrocitos y de la inmadurez de reticulocitos no son estables en el tiempo.
- No se recomienda utilizar parámetros que informen sobre la inmadurez o morfología de hematíes y plaquetas si las muestras de sangre no se analizan de inmediato.

2. CONCLUSIONES GENERALES

- La estabilidad evaluada en varios parámetros de investigación ha permitido cuantificar los cambios que sufren las células debidos al retraso en el análisis, que, hasta ahora, sólo podían advertirse de manera cualitativa mediante la observación del frotis de sangre al microscopio.

- El cálculo del factor de corrección aquí sugerido debe entenderse como un enfoque metodológico a ser estudiado en mayor detalle si la intención es la de aplicarse de manera sistemática.
- Varios parámetros convencionales y de investigación estudiados en esta tesis muestran la falta de estabilidad que sufren las muestras de sangre-EDTA para la evaluación del hemograma, por lo que consideramos que el actual sistema de procesamiento de muestras implantado en el laboratorio clínico de este estudio afecta a la calidad de resultados del hemograma.

LIMITACIONES

X. LIMITACIONES

Esta tesis doctoral utiliza muestras comunes en los tres estudios. Por ejemplo, la imprecisión intradía e interserial es la misma en los tres trabajos, lo que significa que las limitaciones en estos análisis son las mismas para los tres artículos.

A continuación, nombramos las siguientes limitaciones a tener en cuenta en futuras investigaciones:

1. PRIMER ARTÍCULO

1.1 La imprecisión intradía pone de manifiesto un comportamiento común en algunos parámetros, como en NRBC%, EOS%, BASO%, IG% y RET%: todos presentan imprecisiones muy elevadas. Esta situación se debe a que el porcentaje de estas células en la muestra es muy bajo, por lo que pequeñas variaciones en el recuento hacen que en el cálculo se produzcan imprecisiones elevadas. De modo que la imprecisión intradía, que sirve para comprobar la repetibilidad del método, aporta poca información en estos parámetros en los que se observa tanta dispersión.

1.2 La prueba de Kolmogorov-Smirnov mostró una población con distribución normal sólo en los parámetros de hematíes y neutrófilos. La falta de normalidad en leucocitos y plaquetas podría explicarse por la alta proporción de pacientes de Hematología y Oncología incluidos en el estudio (aproximadamente el 40%), de los cuales muchos recibieron transfusión de sangre con concentraciones normales de eritrocitos, pero aún con un recuento diferencial muy distorsionado. Sin embargo, el posterior análisis de correlación mediante Passing Bablock es un test robusto para muestras que no siguen una distribución normal.

1.3 Otra desventaja encontrada durante la recolección de muestras es la dificultad para obtener una amplia variedad de concentraciones en algunos parámetros como eritroblastos o granulocitos inmaduros. A pesar de eso, hemos empleado una metodología estadística completa para minimizar el error y evitar malas interpretaciones.

1.4 No hemos realizado un estudio detallado comparativo con recuentos plaquetarios bajos entre los dos analizadores, aunque otros estudios mostraron una mayor precisión para el XN-2000 debido al canal de plaquetas por fluorescencia. Podría ser de interés precisamente en pacientes trombocitopénicos en los que es relevante la toma de decisiones clínicas relacionadas con un aporte transfusional.

2. SEGUNDO ARTÍCULO

2.1 Un inconveniente de este estudio es que se desconoce el momento exacto de extracción de la muestra, por lo que, aunque fueron analizadas dentro de la primera hora tras la venopunción, el cálculo del factor de corrección que se propone en esta tesis es sólo una propuesta metodológica.

2.2 Para el estudio de estabilidad de alarmas de leucocitos no se realizó un frotis sanguíneo para comprobar la ausencia/presencia de la alarma, por lo que consideramos como valor verdadero al resultado inicial de análisis a tiempo cero.

2.3 Para el estudio de estabilidad de alarmas de leucocitos del total de pacientes inicial (n=284), 217 no presentaron ninguna alarma en ninguna de las horas de análisis. Esto significa, por un lado, que la ausencia de alarmas es estable en el tiempo, es decir, no se generan nuevas alarmas cualitativas de leucocitos con el retraso en el análisis. Sin embargo, la falta de pacientes con alarmas positivas ha hecho que no encontremos una tendencia clara del comportamiento de las alarmas positivas.

3. TERCER ARTÍCULO

3.1 Tal como se ha comentado en el punto 2.1, con el sistema de información que disponemos actualmente no conocemos la hora exacta de extracción de la muestra de sangre.

PROYECCIONES

XI. PROYECCIONES

Los hallazgos encontrados en esta tesis doctoral junto con sus limitaciones podrían generar los siguientes trabajos:

- Estudio de estabilidad de los parámetros del hemograma en las condiciones habituales de trabajo del laboratorio clínico conociendo la **hora exacta** de extracción de la muestra. Para realizar este estudio habría que imitar las condiciones habituales de transporte y procesamiento de muestras. Para ello, debería de realizarse el primer análisis de la muestra en el lugar de extracción y, a continuación, ser transportada por los dos tipos de medios de transporte por los que las muestras llegan al laboratorio: por **tubo neumático** y por **vehículo motor**. Hallar un factor de corrección en los parámetros que sufren alteraciones significativas y evaluar si tras su aplicación se obtienen resultados más cercanos a la medida inicial.
- Con las mismas condiciones anteriormente citadas, realizar un estudio de estabilidad con mayor número de alarmas en las tres series de células y con mayor número de muestras con alarmas positivas.

IMPLICACIONES

XII. IMPLICACIONES

Esta tesis es un análisis de las condiciones habituales de trabajo del laboratorio clínico del Hospital Donostia, el cual comparte similares características y formas de trabajo con otros laboratorios de referencia. Es un estudio de estabilidad de las muestras del hemograma por medio del cual trata de evaluarse las consecuencias de un retraso en el análisis de las muestras.

En esta tesis se analizan tres tipos de parámetros del hemograma: los parámetros convencionales, los parámetros clínicos avanzados y los parámetros de investigación. Uno de los hallazgos encontrados en el segundo y tercer artículo de investigación de esta tesis muestra como sí existen diferencias significativas en términos de estabilidad entre estos tipos de parámetros.

Como se ha explicado anteriormente, los parámetros de investigación informan de la madurez y morfología celular, de modo que, gracias a los hallazgos encontrados en este trabajo es posible cuantificar los cambios que se producen en las células debidas al paso del tiempo por medio de la tecnología disponible en el actual laboratorio clínico. Esta cuantificación permite hallar un factor de corrección que podría aplicarse a aquellos parámetros que sufren cambios significativos debidos a la pérdida de estabilidad.

Es la primera vez que se publica un estudio de estabilidad de los parámetros de investigación de leucocitos. Además, es la primera vez que se publica sobre parámetros de serie roja y plaquetar basándose en criterios de calidad; esto significa que es un estudio en el que se tiene en cuenta la imprecisión del método, así como la variabilidad biológica.

Por medio de este trabajo se ha conseguido cuantificar las variaciones morfológicas que sufren las células como consecuencia de un retraso en el análisis de las muestras. Hasta el momento, estos cambios solo podían medirse cualitativamente mediante el frotis de sangre, pero gracias al acceso a la información que ofertan los parámetros de investigación pueden medirse estos cambios de manera cuantitativa.

Por medio del primer artículo de investigación puede concluirse, en términos generales de comparación de métodos, que el primer analizador (XE-5000) con el que se generó la hipótesis y el segundo analizador (XN-2000) con el que se realizó el estudio de estabilidad de las muestras son ambos intercambiables.

En relación al segundo y tercer artículo de investigación, puede concluirse que las muestras de pacientes de sangre total-EDTA sufren alteraciones significativas debidas al retraso en el análisis en varios de los parámetros convencionales y de investigación del hemograma. Esto se traduce en una disminución de la calidad en la entrega de resultados.

En resumen, el actual sistema de procesamiento de muestras implantado en el laboratorio clínico de este estudio afecta a la calidad de resultados del hemograma. Para evitar esta situación se sugieren dos posibles soluciones:

- Modificar el sistema de transporte y entrega de muestras al laboratorio para analizar las muestras con mayor prontitud.
- Incluir en el sistema informático de laboratorio o bien en el software del analizador un factor de corrección para aquellos parámetros que sufren alteraciones significativas, siempre y cuando se conozca la hora exacta de extracción de la muestra.

REFERENCIAS

XIII. REFERENCIAS

- (1) SEQC (Sociedad Española de Química Clínica). El hemograma. 2017; Available at: <https://labtestsonline.es/tests/hemograma>.
- (2) SEQC (Sociedad Española de Química Clínica). La fórmula leucitaria. 2017; Available at: <https://labtestsonline.es/tests/formula-leucocitaria>.
- (3) SEQC (Sociedad Española de Química Clínica). Las plaquetas. 2017; Available at: <https://labtestsonline.es/tests/plaquetas>.
- (4) Sysmex Europe GmbH. Fluorescence flow cytometry. 2018; Available at: <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/measurement-technologies/fluorescence-flow-cytometry.html>.
- (5) Chaves, Fernando P. Beckman Coulter Scientific Support. Cell Population Data. A new era in laboratory hematology. 2010; Available at: https://smlc.cl/sitio/jrnds2010/presentaciones/cl_22jrnd_mdc.pdf.
- (6) Sysmex Europe GmbH. Research parameter(s). 2018; Available at: <https://www.sysmex-europe.com/academy/library/glossary/research-parameter-s-12.html>.
- (7) Morkis IV, Farias MG, Rigoni LD, Scotti L, Gregianin LJ, Daudt LE, et al. Assessment of immature platelet fraction and immature reticulocyte fraction as predictors of engraftment after hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Lab Hematol* 2015 Apr;37(2):259-264.
- (8) Urrechaga E. Reviewing the value of leukocytes cell population data (CPD) in the management of sepsis. *Ann Transl Med* 2020 Aug;8(15):953-19-3173.
- (9) Jung S, Chae H, Lim J, Oh EJ, Kim Y, Park YJ, et al. Differential blast counts obtained by automated blood cell analyzers. *Korean J Lab Med* 2010 Dec;30(6):540-546.
- (10) Jung YJ, Kim JH, Park YJ, Kahng J, Lee H, Lee KY, et al. Evaluation of cell population data on the UniCel DxH 800 Coulter Cellular Analysis system as a screening for viral infection in children. *Int J Lab Hematol* 2012 Jun;34(3):283-289.
- (11) Dima F, Barison E, Midolo M, Benedetti F, Lippi G. Assessment of haematopoietic progenitor cell counting with the Sysmex((R)) XN-1000 to guide timing of apheresis of peripheral blood stem cells. *Blood Transfus* 2020 Jan;18(1):67-76.
- (12) Furundarena JR, Araiz M, Uranga M, Sainz MR, Agirre A, Trassorras M, et al. The utility of the Sysmex XE-2100 analyzer's NEUT-X and NEUT-Y parameters for detecting neutrophil dysplasia in myelodysplastic syndromes. *Int J Lab Hematol* 2010 Jun;32(3):360-366.

- (13) Kahng J, Kim Y, Kim JO, Koh K, Lee JW, Han K. A novel marker for screening paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using routine complete blood count and cell population data. *Ann Lab Med* 2015 Jan;35(1):35-40.
- (14) Linssen J, Jennissen V, Hildmann J, Reisinger E, Schindler J, Malchau G, et al. Identification and quantification of high fluorescence-stained lymphocytes as antibody synthesizing/secretory cells using the automated routine hematology analyzer XE-2100. *Cytometry B Clin Cytom* 2007 May;72(3):157-166.
- (15) Dumas C, Tirard-Collet P, Mestrallet F, Girard S, Jallades L, Picot S, et al. Flagging performance of Sysmex XN-10 haematology analyser for malaria detection. *J Clin Pathol* 2020 Oct;73(10):676-677.
- (16) Stiel L, Delabranche X, Galois AC, Severac F, Toti F, Mauvieux L, et al. Neutrophil Fluorescence: A New Indicator of Cell Activation During Septic Shock-Induced Disseminated Intravascular Coagulation. *Crit Care Med* 2016 Nov;44(11):e1132-e1136.
- (17) Furundarena JR, Uranga A, Sainz MR, Gonzalez C, Uresandi N, Argoitia N, et al. Usefulness of the lymphocyte positional parameters in the Sysmex XN haematology analyser in lymphoproliferative disorders and mononucleosis syndrome. *Int J Lab Hematol* 2018 Feb;40(1):41-48.
- (18) Buoro S, Seghezzi M, Vavassori M, Dominoni P, Apassiti Esposito S, Manenti B, et al. Clinical significance of cell population data (CPD) on Sysmex XN-9000 in septic patients with or without liver impairment. *Ann Transl Med* 2016 Nov;4(21):418.
- (19) Merino A. Manual de Citología de Sangre Periférica y Líquidos Biológicos. 2ª ed.: Médica panamericana; 2020.
- (20) Sysmex Europe GmbH. Granulación de los neutrófilos (NEUT-SSC*). Available at: <https://www.sysmex.es/academia/centro-de-conocimiento/parametros-clinicos-y-de-investigacion/granulacion-de-neutrofilos-neut-ssc.html>.
- (21) Sysmex Europe GmbH. Lymphocyte activation: reactive lymphocytes (RE-LYMP) and antibody-synthesizing lymphocytes (AS-LYMP). Available at: <https://www.sysmex-europe.com/n/academy/knowledge-centre/sysmex-parameters/re-lympas-lymp.html>.
- (22) Clínica Universidad de Navarra. DICCIONARIO MÉDICO- Leucemia de linfocitos grandes granulares (LLG). Available at: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/leucemia-linfocitos-grandes-granulares>.
- (23) Sysmex Europe GmbH. RET Channel. 2018; Available at: <https://www.sysmex-europe.com/academy/clinic-laboratory/analyser-channels/ret-channel.html>.
- (24) Sysmex Europe GmbH. PLT-F Channel. 2018; Available at: <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/measurement-technologies/plt-f-channel.html>.

- (25) Greinix HT, Linkesch W, Keil F. Early detection of hematopoietic engraftment after bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation by highly fluorescent reticulocyte counts. *Bone Marrow Transplant* 1994;14:307.
- (26) Merino A, SEQC-Educación continuada en el laboratorio clínico 2014-2015. ALTERACIONES MORFOLÓGICAS DE LOS ERITROCITOS. Available at: <https://www.seqc.es/download/tema/3/2767/1052057875/2987076/cms/tema-5-alteraciones-morfologicas-de-los-eritrocitos.pdf/>. Accessed (Ed Cont Lab Clín; 20: 41-64).
- (27) Sysmex Europe GmbH. Fragmented red blood cells (FRC*). Available at: <https://www.sysmex-europe.com/n/academy/knowledge-centre/sysmex-parameters/fragmented-red-blood-cells-frc.html>.
- (28) Davidsohn I, Henry JB, Todd-Sanford. Diagnóstico clínico por el laboratorio. 5a ed. Barcelona etc.: Salvat; 1972.
- (29) Quinteiro García A, Unzaga Basauri I, Arcelay Salazar A, Armentia Macazaga, JM, Vesga Carasa, et al. Red de Diagnóstico Biológico de Osakidetza. 2017; Available at: https://www.fundacionsigno.com/archivos/15_barea_2017/01_Red_diagnostico.pdf.
- (30) Osakidetza. Adquisición e Implantación de un Sistema de información para los laboratorios de Osakidetza. 2015; Available at: https://www.euskadi.eus/gobierno-vasco/contenidos/anuncio_contratacion/exposakidetza23551/es_doc/adjuntos/pliego_bases_tecnicas1.pdf.
- (31) Marzana Sanz I, Ibarz Escuer M, Llopis Diaz MA, Barba Meseguer N, Alsina Kirchner MJ, Martínez Espartosa D, et al. Recomendaciones para el diseño e implementación de un programa de aseguramiento de la calidad de la fase preanalítica. *Revista del Laboratorio Clínico* 2019 October–December 2019;12(4):e54-e65.
- (32) Tatsumi N, Miwa S, Lewis SM, International Society of Hematology, and the International Council for Standardization in Haematology. Specimen collection, storage, and transmission to the laboratory for hematological tests. *Int J Hematol* 2002 Apr;75(3):261-268.
- (33) Imeri F, Herklotz R, Risch L, Arbetsleitner C, Zerlauth M, Risch G, et al. Stability of hematological analytes depends on the hematology analyser used: A stability study with Bayer Advia 120, Beckman Coulter LH 750 and Sysmex XE 2100. *Clinica Chimica Acta* 2008 11;397(1–2):68-71.
- (34) Zini G, International Council for Standardization in Haematology (ICSH). Stability of complete blood count parameters with storage: toward defined specifications for different diagnostic applications. *International Journal of Laboratory Hematology* 2014;36(2):111-113.

- (35) Peakman TC, Elliott P. The UK Biobank sample handling and storage validation studies. *Int J Epidemiol* 2008 Apr;37 Suppl 1:i2-6.
- (36) Elliott P, Peakman TC, UK Biobank. The UK Biobank sample handling and storage protocol for the collection, processing and archiving of human blood and urine. *Int J Epidemiol* 2008 Apr;37(2):234-244.
- (37) Robinson N, Giraud S, Schumacher YO, Saugy M. Influence of transport and time on blood variables commonly measured for the athlete biological passport. *Drug Test Anal* 2016 Feb;8(2):199-207.
- (38) Robinson N, Kirchbichler A, Banuls O, Mader M, Aikin R, Sottas PE, et al. Validation of a Blood Stability Score as an easy-to-use blood sample quality index. *Int J Lab Hematol* 2016 Dec;38(6):685-693.
- (39) Robinson N, Sottas PE, Pottgiesser T, Schumacher YO, Saugy M. Stability and robustness of blood variables in an antidoping context. *Int J Lab Hematol* 2011 Apr;33(2):146-153.
- (40) Vives-Corrons J, Briggs C, Simon-Lopez R, Albareda S, de la Salle B, Flegar-Meatrui Z, et al. Effect of EDTA-anticoagulated whole blood storage on cell morphology examination. A need for standardization. *International Journal of Laboratory Hematology* 2014;36(2):222-226.
- (41) Brisou G, Manzoni D, Dalle S, Felman P, Morel D, Boubaya M, et al. Alarms and parameters generated by hematology analyzer: new tools to predict and quantify circulating Sezary cells. *J Clin Lab Anal* 2015 Mar;29(2):153-161.
- (42) Ricos C, Alvarez V, Minchinela J, Fernandez-Calle P, Perich C, Boned B, et al. Biologic Variation Approach to Daily Laboratory. *Clin Lab Med* 2017 Mar;37(1):47-56.
- (43) Sysmex Europe GmbH. XN-Series Clinical Case Report Vol. First edition. 2011.
- (44) Sysmex Europe GmbH. MÉTODO DE DETECCIÓN DE FLUJO ENVOLVENTE DE CORRIENTE CONTINUA. Available at: <https://www.sysmex.es/academia/centro-de-conocimiento/tecnologia/metodo-de-deteccion-de-flujo-envolvente-de-corriente-continua.html>.
- (45) Sysmex Europe GmbH. PARÁMETRO(S) DE DIAGNÓSTICO. Available at: <https://www.sysmex.es/n/academia/biblioteca/glosario.html>.
- (46) Sysmex Europe GmbH. PARÁMETROS CLÍNICOS AVANZADOS. Available at: <https://www.sysmex.es/n/academia/biblioteca/glosario.html>.
- (47) Sysmex Europe GmbH. PARÁMETRO(S) DE INVESTIGACIÓN. Available at: <https://www.sysmex.es/n/academia/biblioteca/glosario.html>.

- (48) International Council for Standardization in Haematology, Writing Group, Briggs C, Culp N, Davis B, d'Onofrio G, Zini G, et al. ICSH guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting. *Int J Lab Hematol* 2014 Dec;36(6):613-627.
- (49) Martínez E, Gella FJ, Alonso N, Boned B, Canalías F, Izquierdo S, et al. Recomendaciones para el estudio de la veracidad en el laboratorio clínico mediante la comparación de procedimientos de medida. Documentos de la SECQ 2011.
- (50) Pineda P, Prada E, Prieto S. Métodos Estadísticos en la Comparación de Equipos de Laboratorio. Asociación Española de Biopatología Médica AEBM . 2015; Available at: <http://www.aebm.org/publicaciones-y-documentos/publicaciones-de-la-aebm.html>.
- (51) Gella FJ. Protocolos de evaluación de sistemas analíticos. In: Martínez M, Prieto B, Torres J, editors. Actualización en la selección y evaluación de sistemas analíticos Barcelona: Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular; 2013. p. 55-83.
- (52) Ruzicka K, Veitl M, Thalhammer-Scherrer R, Schwarzingler I. The new hematology analyzer Sysmex XE-2100: performance evaluation of a novel white blood cell differential technology. *Arch Pathol Lab Med* 2001 Mar;125(3):391-396.
- (53) Sysmex Europe GmbH. Canal WPC. Available at: <https://www.sysmex-europe.com/n/academy/knowledge-centre/technologies/wpc-channel.html>.
- (54) Zini G, Bain B, Bettelheim P, Cortez J, d'Onofrio G, Faber E, et al. A European consensus report on blood cell identification: terminology utilized and morphological diagnosis concordance among 28 experts from 17 countries within the European LeukemiaNet network WP10, on behalf of the ELN Morphology Faculty. *Br J Haematol* 2010 Nov;151(4):359-364.
- (55) Palmer L, Briggs C, McFadden S, Zini G, Burthem J, Rozenberg G, et al. ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features. *Int J Lab Hematol* 2015 Jun;37(3):287-303.
- (56) Zimmermann M, Cremer M, Hoffmann C, Weimann K, Weimann A. Granularity Index of the SYSMEX XE-5000 hematology analyzer as a replacement for manual microscopy of toxic granulation neutrophils in patients with inflammatory diseases. *Clin Chem Lab Med* 2011 Jul;49(7):1193-1198.
- (57) Zimmermann M, Steenhuis P, Linssen J, Weimann A. Detection and quantification of hypo- and hypergranulated neutrophils on the new Sysmex XN hematology analyzer: establishment of an adapted reference interval for the neutrophil-granularity-intensity compared to XE-technology in adult patients. *Clin Lab* 2015;61(3-4):235-241.

- (58) Luo Y, Lin J, Chen H, Zhang J, Peng S, Kuang M. Utility of neut-X, neut-Y and neut-Z parameters for rapidly assessing sepsis in tumor patients. *Clin Chim Acta* 2013 Jun 25;422:5-9.
- (59) Zonneveld R, Molema G, Plotz FB. Analyzing Neutrophil Morphology, Mechanics, and Motility in Sepsis: Options and Challenges for Novel Bedside Technologies. *Crit Care Med* 2016 Jan;44(1):218-228.
- (60) Le Roux G, Vlad A, Eclache V, Malanquin C, Collon JF, Gantier M, et al. Routine diagnostic procedures of myelodysplastic syndromes: value of a structural blood cell parameter (NEUT-X) determined by the Sysmex XE-2100. *Int J Lab Hematol* 2010 Dec;32(6 Pt 1):e237-43.
- (61) Goel S, Sachdev R, Gajendra S, Jha B, Sahni T, Dorwal P, et al. Picking up myelodysplastic syndromes and megaloblastic anemias on peripheral blood: use of NEUT-X and NEUT-Y in guiding smear reviews. *Int J Lab Hematol* 2015 Apr;37(2):e48-51.
- (62) Brunning RD, Orazi A, Germing U, Le Beau MM, Porwit A, Baumann I, Vardiman JW, Hellstrom-Lindberg E. Myelodysplastic syndromes/neoplasms, overview. In: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Swerdlow EH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (eds). Lyon: WHO, 2008: 88–93.
- (63) Gulati GL, Hyland LJ, Kocher W, Schwarting R. Changes in automated complete blood cell count and differential leukocyte count results induced by storage of blood at room temperature. *Arch Pathol Lab Med* 2002 Mar;126(3):336-342.
- (64) Lippi G, Salvagno GL, Solero GP, Franchini M, Guidi GC. Stability of blood cell counts, hematologic parameters and reticulocytes indexes on the Advia A120 hematologic analyzer. *J Lab Clin Med* 2005 12;146(6):333-340.
- (65) Ruutu T, Barosi G, Benjamin RJ, Clark RE, George JN, Gratwohl A, et al. Diagnostic criteria for hematopoietic stem cell transplant-associated microangiopathy: results of a consensus process by an International Working Group. *Haematologica* 2007 Jan;92(1):95-100.
- (66) Jodele S, Laskin BL, Dandoy CE, Myers KC, El-Bietar J, Davies SM, et al. A new paradigm: Diagnosis and management of HSCT-associated thrombotic microangiopathy as multi-system endothelial injury. *Blood Rev* 2015 May;29(3):191-204.
- (67) Jodele S, Dandoy CE, Myers KC, El-Bietar J, Nelson A, Wallace G, et al. New approaches in the diagnosis, pathophysiology, and treatment of pediatric hematopoietic stem cell transplantation-associated thrombotic microangiopathy. *Transfusion Apheresis Sci* 2016 4;54(2):181-190.

- (68) Buttarello M, Plebani M. Automated Blood Cell Counts. Am J Clin Pathol 2008 The Oxford University Press;130(1):104-116.
- (69) Urrechaga E, Borque L, Escanero JF. Erythrocyte and reticulocyte indices in the assessment of erythropoiesis activity and iron availability. Int J Lab Hematol 2013 Apr;35(2):144-149.
- (70) Urrechaga E, Boveda O, Aguayo FJ, de la Hera P, Munoz RI, Gallardo I, et al. Percentage of hypochromic erythrocytes and reticulocyte hemoglobin equivalent predictors of response to intravenous iron in hemodialysis patients. Int J Lab Hematol 2016 Aug;38(4):360-365.
- (71) Buttarello M, Pajola R, Novello E, Mezzapelle G, Plebani M. Evaluation of the hypochromic erythrocyte and reticulocyte hemoglobin content provided by the Sysmex XE-5000 analyzer in diagnosis of iron deficiency erythropoiesis. Clin Chem Lab Med 2016 Dec 1;54(12):1939-1945.
- (72) Ermens AA, Hoffmann JJ, Krockenberger M, Van Wijk EM. New erythrocyte and reticulocyte parameters on CELL-DYN Sapphire: analytical and preanalytical aspects. Int J Lab Hematol 2012 Jun;34(3):274-282.
- (73) Archer NM, Brugnara C. Diagnosis of iron-deficient states. Crit Rev Clin Lab Sci 2015;52(5):256-272.
- (74) Buttarello M, Pajola R, Novello E, Rebeschini M, Cantaro S, Olios F, et al. Diagnosis of iron deficiency in patients undergoing hemodialysis. Am J Clin Pathol 2010 Jun;133(6):949-954.
- (75) Lesesve JF, Lacombe F, Marit G, Bernard P, Balloç F, Reiffers J. High fluorescence reticulocytes are an indicator of bone marrow recovery after chemotherapy. Eur J Haematol 1995;54:61.
- (76) Kanold J, Bezou MJ, Coulet M. Evaluation of erythropoietic/hematopoietic reconstitution after BMT by highly fluorescent reticulocyte counts compares favorably with traditional peripheral blood cell counting. Bone Marrow Transplant 1993;11:313.
- (77) Kuse R. The appearance of reticulocytes with medium or high RNA content is a sensitive indicator of beginning granulocyte recovery after aplasiogenic cytostatic drug therapy in patients with AML. Ann Haematol 1993;66:213.
- (78) Kuse R, Foures C, Jou JM, D'Onofrio G, Paterakis G. Automated reticulocyte counting for monitoring patients on chemotherapy for acute leukaemias and malignant lymphomas. Clin Lab Haematol 1996;18:39.
- (79) Torres A, Sanchez J, Lakomsky D, Serrano J, Alvarez MA, Martin C, et al. Assessment of hematologic progenitor engraftment by complete reticulocyte

maturation parameters after autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2001 Jan;86(1):24-29.

(80) Noronha JF, De Souza CA, Vigorito AC, Aranha FJ, Zulli R, Miranda EC, et al. Immature reticulocytes as an early predictor of engraftment in autologous and allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Lab Haematol* 2003 Feb;25(1):47-54.

(81) Daves M, Zagler EM, Cemin R, Gnech F, Joos A, Platzgummer S, et al. Sample stability for complete blood cell count using the Sysmex XN haematological analyser. *Blood Transfus* 2015 Oct;13(4):576-582.

(82) Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2004 Jul;126(1):93-99.

(83) Abe Y, Wada H, Tomatsu H, Sakaguchi A, Nishioka J, Yabu Y, et al. A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF). *Thromb Res* 2006;118(4):463-469.

(84) Macchi I, Chamlian V, Sadoun A, Le Dirach A, Guilhot J, Guilhot F, et al. Comparison of reticulated platelet count and mean platelet volume determination in the evaluation of bone marrow recovery after aplastic chemotherapy. *Eur J Haematol* 2002 Sep;69(3):152-157.

(85) Stohlawetz P, Stiegler G, Knobl P, Hocker P, Panzer S. The rise of reticulated platelets after intensive chemotherapy for AML reduces the need for platelet transfusions. *Ann Hematol* 1999 Jun;78(6):271-273.

(86) Chaoui D, Chakroun T, Robert F, Rio B, Belhocine R, Legrand O, et al. Reticulated platelets: a reliable measure to reduce prophylactic platelet transfusions after intensive chemotherapy. *Transfusion* 2005 May;45(5):766-772.

(87) Briggs C, Hart D, Kunka S, Oguni S, Machin SJ. Immature platelet fraction measurement: a future guide to platelet transfusion requirement after haematopoietic stem cell transplantation. *Transfus Med* 2006 Apr;16(2):101-109.

(88) Takami A, Shibayama M, Orito M, Omote M, Okumura H, Yamashita T, et al. Immature platelet fraction for prediction of platelet engraftment after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007 Apr;39(8):501-507.

(89) Osei-Bimpong A, Saleh M, Sola-Visner M, Widness J, Veng-Pedersen P. Correction for effect of cold storage on immature platelet fraction. *J Clin Lab Anal* 2010;24(6):431-433.

(90) Osei-Bimpong A. The effect of storage on the clinical utility of the immature platelet fraction. *Hematology* 2009 Apr;14(2):118-121.

Esta tesis es un análisis de las condiciones habituales de trabajo del laboratorio clínico de un hospital universitario de nivel terciario, el cual comparte similares características y formas de trabajo con otros laboratorios de referencia. Es un estudio de estabilidad de las muestras del hemograma por medio del cual trata de evaluarse las consecuencias de un retraso en el análisis de las muestras.

En esta tesis se analizan tres tipos de parámetros del hemograma: los parámetros convencionales, los parámetros clínicos avanzados y los parámetros de investigación. Uno de los hallazgos encontrados en el segundo y tercer artículo de investigación de esta tesis muestra como sí existen diferencias significativas en términos de estabilidad entre estos tipos de parámetros. Los parámetros de investigación son propios de cada analizador y su casa comercial; informan de la madurez y morfología celular, de modo que, gracias a los hallazgos encontrados en este trabajo es posible cuantificar los cambios que se producen en las células debidas al paso del tiempo por medio de la tecnología disponible en el actual laboratorio clínico. Esta cuantificación permite hallar un factor de corrección que podría aplicarse a aquellos parámetros que sufren cambios significativos debidos a la pérdida de estabilidad.

Por medio de este trabajo se ha conseguido cuantificar las variaciones morfológicas que sufren las células como consecuencia de un retraso en el análisis de las muestras teniendo en cuenta la imprecisión del método y la variabilidad biológica. Hasta el momento, estos cambios sólo podían medirse cualitativamente mediante el frotis de sangre, pero gracias al acceso a la información que ofertan los parámetros de investigación pueden medirse estos cambios de manera cuantitativa.